JUSTUS LIEBIGS

ANNALEN DER CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON

H. WIELAND

BAND 552

MIT 36 FIGUREN IM TEXT

1942
(Nachdruck 1960)

VERLAG CHEMIE · WEINHEIM/BERGSTR. UND BERLIN
JOHNSON REPRINT CORPORATION · NEW YORK

POLITECHNIKA ŚLĄSKA
BIBLIOTEKA GŁÓWNA
w Gliwicach
P. 105/42/II

P.378/60

© Verlag Chemie, GmbH., Berlin 1942
Printed in Germany. Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung, vorbehalten.
Druck: Lessing Druckerei, Wiesbaden
Verlagsnummer 6004

Inhalt des 552. Bandes.

Seite

Fritz Kögl und Haaye Veldstra, Über Muscarin. II. 1

Clemens Schöpf und Kurt Koch, Über Samandaron und Samandaridin, Nebenalkaloide im Gift des Feuer- und Alpensalamanders 37

Clemens Schöpf und Kurt Koch (mitbearbeitet von Wilhelm Contzen), Die Konstitution des Samandarins 62

B. Flaschenträger und Rosa Allemann, Synthese von Glycol-α,α'-disebacinsäure und Glycerin-α,β,α'-trisebacinsäure. Stoffwechselversuch mit Glycol-α,α'-disebacinsäure und Sebacinsäure 106

Elisabeth Dane und Otto Höss, Synthesen in der hydroaromatischen Reihe. VII. Die Darstellung von partiell hydrierten Derivaten der 7-Methoxy-phenanthren-2-carbonsäure und des 7-Methoxy-2-acetophenanthrens 113

Karl Freudenberg und Hermann Richtzenhain, Die Konstitution des Dehydro-di-isoeugenols und seine Bedeutung für die Chemie des Lignins 126

A. Windaus, U. Riemann und G. Zühlsdorff, Über die Einwirkung von Mercuri-acetat auf $\Delta_{6,8}$-Cholestadien-3-ol (Isodehydrocholesterin). Mit 4 Figuren im Text 135

A. Windaus, U. Riemann, H. H. Rüggeberg und G. Zühlsdorff, Über die Einwirkung von Bleitetra-acetat auf Isodehydro-cholesterin 142

Hans Fischer und Heinz Gibian, Übergang von der Chlorophyll b- in die a-Reihe 153

Günther Endres und Ellen Rohr, Zur Kenntnis der baktericiden Wirkung. I. Über das Desinfektionsvermögen der Alkohole in nichtwäßrigen Lösungsmitteln 167

Margarete Bülow, Über die Verwertbarkeit verschiedener Substrate für die Zellatmung 176

Michael Deffner, Über den Stoffwechsel des Schimmelpilzes Aspergillus niger. I. Abbau der Citronensäure. Mit 1 Figur im Text 191

F. G. Fischer, A. Roedig und K. Rauch, Über Fumarat-Hydrase als gelbes Ferment. Biochemische Hydrierungen IX. Mit 1 Figur im Text 203

Wilhelm Franke und Fritz Schumann, Zur Kenntnis der pflanzlichen Aldehyd-Dehydrasen. I. Mit 8 Figuren im Text 243

Feodor Lynen, Zum biologischen Abbau der Essigsäure. I. Über die „Induktionszeit" bei verarmter Hefe. Mit 22 Figuren im Text 270

Alphabetisches Autorenregister.

Allemann, Rosa, siehe B. Flaschenträger.
Bülow, Margarete 176.
Contzen, Wilhelm, siehe Clemens Schöpf.
Dane, Elisabeth, und Otto Höss 113.
Deffner, Michael 191.
Endres, Günther, und Ellen Rohr 167.
Fischer, F. G., A. Roedig und K. Rauch 203.
Fischer, Hans, und Heinz Gibian 153.
Flaschenträger, B., und Rosa Allemann 106.
Franke, Wilhelm, und Fritz Schumann 243.
Freudenberg, Karl, und Hermann Richtzenhain 126.
Gibian, Heinz, siehe Hans Fischer.
Höss, Otto, siehe Elisabeth Dane.
Koch, Kurt, siehe Clemens Schöpf.
Kögl, Fritz, und Haaye Veldstra 1.
Lynen, Feodor 270.
Rauch, K., s. F. G. Fischer.
Richtzenhain, Hermann, s. Karl Freudenberg.
Riemann, U., s. A. Windaus.
Roedig, A., s. F. G. Fischer.
Rohr, Ellen, siehe Günther Endres.
Rüggeberg, H. H., s. A. Windaus.
Schöpf, Clemens, und Kurt Koch 37.
Schöpf, Clemens, und Kurt Koch (mit Wilh. Contzen) 62.
Schumann, Fritz, siehe Wilhelm Franke.
Veldstra, Haaye, siehe Fritz Kögl.
Windaus, A., U. Riemann und G. Zühlsdorff 135.
Windaus, A., U. Riemann, H. H. Rüggeberg u. G. Zühlsdorff 142.
Zühlsdorff, G., s. A. Windaus.

JUSTUS LIEBIGS
ANNALEN DER CHEMIE

552. Band

Über Muscarin. II.

von *Fritz Kögl*[1]) und *Haaye Veldstra.*

(Aus dem Organisch-chemischen Laboratorium der Rijks-Universiteit Utrecht.)

(Eingelaufen am 4. Juni 1942.)

Im Jahre 1931 haben F. Kögl[2]), H. Duisberg und H. Erxleben eine Untersuchung über die Konstitution des Muscarins veröffentlicht. Während die Reindarstellung dieses altbekannten und pharmakologisch bedeutsamen Giftes des Fliegenpilzes früher bereits anderen Autoren gelungen war, hatten sich ältere Angaben über die Konstitution des Muscarins als irrtümlich erwiesen. Nach der Schmiedeberg-Harnackschen Formel sollte es sich bei dem Giftstoff um Betainaldehyd handeln und in der Tat hatte man durch Oxydation von Cholin mit Salpetersäure eine muscarinähnlich wirkende Verbindung erhalten. Dieses „synthetische Muscarin" war jedoch im Gegensatz zum natürlichen Gift alkaliempfindlich; es erwies sich als identisch mit Cholinnitrit, während der später ebenfalls dargestellte Betain-aldehyd keine besondere pharmakologische Wirkung zeigte.

[1]) Diese Arbeit ist meinem verehrten Lehrer, Herrn Geheimrat H. Wieland zum 65. Geburtstag gewidmet. F. K.

[2]) 1. Mitt. A. 489, 156 (1931). Die damals geplante Arbeitsreihe „Untersuchungen über Pilzgifte" wird auf Muscarin beschränkt bleiben; in diesem Zusammenhang sei auf die erfolgreichen Arbeiten von H. Wieland und Mitarbeitern über die Giftstoffe des Knollenblätterschwamms verwiesen [A. 548, 1 (1941) u. früher].

Unserer eigenen Untersuchung waren durch die geringe zur Verfügung stehende Substanzmenge (370 mg Muscarin-Reineckat, entsprechend 137 mg Muscarinbase) enge Grenzen gesetzt. Abgesehen von den Analysen und verschiedenen Mikroreaktionen hatte uns vor allem der glückliche Verlauf des Hofmannschen Abbaus zu einem entscheidenden Einblick in die Konstitution des Muscarins geführt. Muscarinchlorid kommt nach unseren Analysen die Formel $[C_8H_{18}O_2N]^+Cl^-$ zu; bei der Behandlung mit Silberoxyd haben wir neben Trimethylamin eine rechtsdrehende Säure der Formel $(C_4H_9O_2)$. COOH isoliert. Nach dem Schmelzpunkt konnte es sich um α,β-Dioxy-valeriansäure handeln und in der Tat gab der synthetisch dargestellte p-Phenylphenacylester mit jenem der Abbausäure keine Schmelzpunktserniedrigung. Bei der Spaltung der synthetischen Säure konnte nur der andere Antipode optisch rein erhalten werden[1]). Abgesehen davon, daß die Antipoden bzw. ihre Ester keine Schmelzpunktserniedrigung zeigten, hat uns vor allem der eingehende krystallographische Vergleich, den wir Herrn Prof. Dr. H. Steinmetz verdankten, davon überzeugt, daß es sich bei unserer Abbausäure in der Tat um α,β-Dioxy-n-valeriansäure handelte.

Die Bildung der α,β-Dioxyvaleriansäure (III) ließ sich auf befriedigende Weise erklären, als wir durch die Darstellung von Benzoylmuscarin eine alkoholische Hydroxylgruppe und durch den positiven Ausfall der Farbreaktionen mit fuchsinschwefliger Säure sowie mit Nitroxyl eine Aldehydgruppe im Muscarin nachweisen konnten:

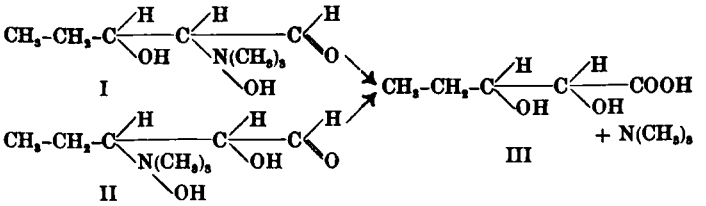
---

[1]) Leider ist in unserer 1. Mitteilung bei den Angaben über die spezifische Drehung der Abbausäure sowie der synthetischen α,β-Dioxyvaleriansäure und den Brucinsalzen der letzteren ein Fehler unterlaufen. Irrtümlicherweise wurde nämlich bei den abgelesenen Drehungswinkeln das Komma um eine Dezimale nach rechts verschoben. Die spezifischen Drehungen sind also in Wirklichkeit 10-mal kleiner als angegeben. Eine neue Bestimmung ergab für α,β-Dioxyvaleriansäure

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-0{,}11.100}{0{,}5.1{,}235} = -17{,}8°,$$

für das Brucinsalz

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-0{,}12.100}{0{,}5.0{,}87} = -27{,}6°.$$



Von den beiden, nunmehr für Muscarin in Betracht kommenden Strukturformeln hielten wir I mit „Serin-Stellung" der Substituenten für wahrscheinlicher; zwischen beiden Möglichkeiten, sowie über die Konfiguration an den beiden Asymmetriezentren sollte auf synthetischem Wege eine Entscheidung getroffen werden.

Die genannte Aufgabe war während der seither vergangenen Jahre in unserem Laboratorium Gegenstand umfangreicher synthetischer Untersuchungen. Leider hat sich die Erwartung, daß es unschwer gelingen würde, das „Muscarin-Rätsel" nunmehr auf synthetischem Wege rasch zur endgültigen Lösung zu bringen, als trügerisch erwiesen. Obschon es sich scheinbar um sehr einfach gebaute Moleküle handelt, verursacht die unmittelbare Nachbarschaft des alkoholischen Hydroxyls, des basischen Restes und der Aldehydgruppe für Wahl und Anwendung der synthetischen Methoden beträchtliche Schwierigkeiten. Nun leiten sich jedoch von den Strukturformeln I und II jeweils zwei Epimere ab; erst wenn die vier verschiedenen Racemate synthetisch dargestellt waren und wenn keines davon die entsprechende pharmakologische Wirksamkeit zeigte, wäre die Unrichtigkeit unserer Muscarinformeln auf synthetischem Wege erwiesen.

Bedauerlicherweise konnten wir trotz der vielen Arbeit, die wir dem Problem gewidmet haben, das gestellte Ziel noch nicht erreichen. Die beiden bisher dargestellten quaternären Ammoniumbasen von α-Amino-β-oxy-valeraldehyd bzw. α-Oxy-β-amino-valeraldehyd, sowie die als Modellsubstanzen gewonnenen, analogen Derivate von Butyraldehyd zeigten keine nennenswerte Muscarinwirkung. Es möge jedoch schon an dieser Stelle hervorgehoben werden, daß hiermit keine Entscheidung *gegen* unsere Muscarinformeln erbracht ist. Wir

erinnern vielmehr an die Erfahrungen, welche vor einigen Jahren von W. C. Rose[1]) und Mitarbeitern über die physiologische Wirksamkeit von *Threonin* und die Unwirksamkeit der synthetisch leichter zugänglichen epimeren Form der α-Amino-β-oxy-buttersäure (Allothreonin) gemacht worden sind; diese waren für uns selbst eine Ermutigung, die synthetische Arbeitsrichtung trotz vieler Enttäuschungen fortzusetzen.

Da sich das Versuchsmaterial sehr angehäuft hat und unsere Ergebnisse für das Muscarin-Problem und wohl auch in allgemein chemischer Hinsicht von Interesse sein dürften, erscheint es angezeigt, nunmehr die wichtigeren Befunde zu veröffentlichen. Die vorliegende Arbeit[2]) behandelt die bis zum Jahre 1936 erhaltenen Ergebnisse.

I. Synthese entsprechender Aldehydbasen mit „Serin-Stellung" der Substituenten.

(*Weg über die α-Brom-β-methoxy-aldehyde.*)

Nach den Erfahrungen von A. Kirrmann[3]) lassen sich α-Aminoaldehyde durch Umsetzung von α-Bromaldehyden mit Aminen ziemlich glatt gewinnen. In unserem Falle war jedoch bei Anwendung von α-Brom-β-oxy-valeraldehyd damit zu rechnen, daß durch HBr-Abspaltung zunächst eine Epoxyverbindung entsteht, an die dann das Amin unter Bildung eines β-Amino-α-oxy-derivats addiert würde. In der Literatur[4]) ist diese Reaktionsweise vor allem bei den entsprechend substituierten Säuren[5]) beschrieben; aber auch aus α-Chlor-β-oxy-propionaldehyd-acetal wurde mit Ammoniak fast aus-

[1]) J. Biol. Chem. **112**, 283 (1935) und **115**, 721 (1936).

[2]) Vgl. Dissertation H. Veldstra, Utrecht, 4. November 1935.

[3]) A. ch. (10) **11**, 223 (1929).

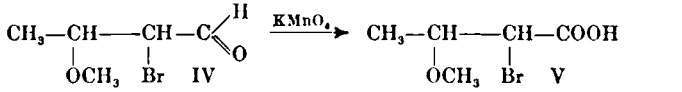
[4]) E. Erlenmeyer, B. **13**, 1077 (1880); E. Erlenmeyer jr., A. **271**, 156, 177 (1892); F. Knoop, B. **52**, 2266 (1919); M. Oesterlin, C. **1929**, II, 1398; E. Fourneau, Bl. (4) **47**, 876 (1930).

[5]) Im Versuchsteil beschreiben wir die Umsetzung von α-Chlor-β-oxyvaleriansäure mit Dimethylamin; die Konstitution des Reaktionsproduktes (α-Oxy-β-dimethylamino-valeriansäure) wurde durch den Abbau zu α-Dimethylamino-n-butyraldehyd nach R. Criegee, [A. **481**, 263 (1930); B. **64**, 260 (1931)] bewiesen. Vgl. auch H. Oêda, Bull. Chem. Soc. Jap. **9**, 8 (1934).

schließlich das β-Aminoderivat erhalten[1]). Weiterhin ist bekannt — und wir haben uns auch bei eigenen Versuchen davon überzeugt — daß die Reaktion durch Acetylierung der Hydroxylgruppe nicht in die hier gewünschte Richtung zu leiten ist. Es war daher nicht zu vermeiden, für die Umsetzung die betreffenden β-Methoxyderivate heranzuziehen, obschon die spätere Entmethylierung bei diesen empfindlichen Aldehyden eine gefährliche Reaktionsstufe darstellte. Man konnte jedoch erwarten, daß die methylierten Aldehyde verhältnismäßig leicht zugänglich sein würden, nachdem K. Meinel[2]) gezeigt hatte, daß ungesättigte Verbindungen bei der Einwirkung von Brom in Methanollösung in vielen Fällen Methyl-hypobromit addieren. Wir haben uns zunächst davon überzeugt, daß dies auch bei α,β-*Pentenal* der Fall ist; für die präparative Bearbeitung der Reaktion und zur Prüfung der Frage, ob die Addition in der gewünschten Richtung — d. h. unter Bildung der α-Brom-β-methoxy-aldehyde erfolgt — haben wir aus praktischen Gründen *Crotonaldehyd* herangezogen.

Die Versuche zeigten, daß beim Einleiten von Bromdampf in eine Lösung von Crotonaldehyd in absolutem Methanol hauptsächlich ein Brom-methoxy-butyraldehyd-dimethyl-acetal entsteht. Durch Zusatz von etwas Wasser kann die Acetatbildung zurückgedrängt werden, und zwar erhielten wir in 75-proc. Methanol die günstigste Ausbeute an freiem Aldehyd, neben dem Acetal und Monobrom-croton-aldehyd.

Um die Stellung der Substituenten zu beweisen, wurde der erhaltene Brom-methoxy-aldehyd in folgender Weise[3]) abgebaut:



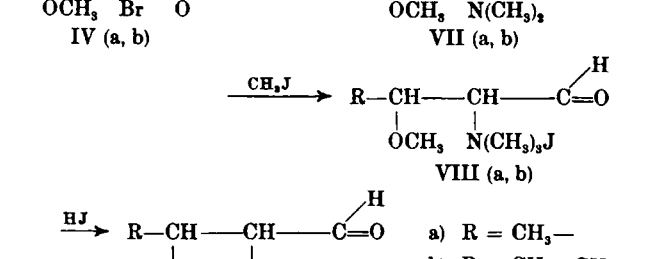
[1]) A. Wohl u. H. Schweitzer, B. **40**, 92 (1907).

[2]) Naturwiss. **21**, 364 (1932); A. **510**, 129 (1934); **516**, 231 (1935). Vgl. auch E. L. Jackson und Mitarbeiter, Am. Chem. Soc. **46**, 1727 (1924); **48**, 2166 (1926); **49**, 2071 (1927); **50**, 2256 (1928).

[3]) Vgl. hierzu den Abbau aromatischer Halogen-methoxy-säuren, E. L. Jackson u. L. Pasiut, Am. Chem. Soc. **50**, 2256 (1928).

Nach Isolierung der β-Methoxy-crotonsäure (VI) vom Schmelzp. 128,5°, sowie von Aceton-dinitro-phenyl-hydrazon bei deren Spaltung mit Säure bestand kein Zweifel mehr, daß unserem Ausgangsmaterial Struktur IV zukam; für das Vorliegen eines Gemisches der beiden stereoisomeren Formen ergab sich kein Anhaltspunkt.

Während die Umsetzung des α-Brom-β-methoxy-crotonaldehyds mit Trimethylamin nicht in der gewünschten Weise verlief, konnte das mit Dimethylamin entstehende Reaktionsprodukt durch Vakuumdestillation fraktioniert werden; die Ausbeute an reinem α-Dimethylamino-β-methoxy-n-butyraldehyd (VIIa) war allerdings bescheiden. Die Aldehydbase addierte in Methanollösung sehr rasch Methyljodid, wobei ein aus Alkohol umzukrystallisierendes Trimethyl-ammoniumjodid (VIIIa) entstand. Zur Entmethylierung ließen wir in einer Zeisel-Apparatur kurze Zeit Jodwasserstoffsäure (1,7) bei 120—125° einwirken, wobei der Verlauf der Reaktion durch die AgJ-Abscheidung kontrolliert wurde. Aus dem Reaktionsgemisch konnte nach Verdünnen mit Wasser ein krystallisiertes Reineckat ausgefällt werden, das die entsprechend Formel IXa zu erwartenden Analysenwerte gab.



Das Reineckat wurde nach J. Kapfhammer[1]) und C. Bischoff in das Chlorid umgewandelt; dieses reduzierte

[1]) H. **191**, 182 (1930).

Fehlingsche Lösung bereits bei gewöhnlicher Temperatur, gab jedoch keine typische Farbreaktion mit fuchsinschwefliger Säure. Zur Charakterisierung wurde noch das Chloroaurat dargestellt, das bei 116° unter Zers. schmolz und den richtigen Goldgehalt zeigte.

Für die entsprechende Synthese in der *Pentan-Reihe* haben wir das benötigte α,β-Pentenal hauptsächlich aus 2-Pentenol-1 dargestellt, das nach M. Bouis bzw. Ch. Prévost[1]) gewonnen war, und nach R. Delaby und S. G. Allègre[2]) zum Aldehyd oxydiert wurde; nach den Methoden von F. G. Fischer[3]) und K. Löwenberg, sowie von J. v. Braun[4]) konnten keine günstigeren Ausbeuten erzielt werden. Die Reaktion mit Brom in Methanol entsprach völlig jener des Crotonaldehyds. Da α,β-Pentenal sehr viel kostbarer ist, haben wir davon abgesehen, die Struktur des α-Brom-β-methoxy-n-valeraldehyds (IVb) ebenso wie beim niedrigeren Homologen genau zu beweisen; die beiden Bromaldehyde reizen zu Tränen und sind auch in den übrigen Eigenschaften völlig analog. Der durch Umsetzung mit Dimethylamin in absolutem Äther zu gewinnende α-Dimethylamino-β-methoxy-n-valeraldehyd (VIIb) addierte leicht Methyljodid, und das gebildete quaternäre Jodid (VIIIb) konnte ebenfalls durch Umkrystallisieren gereinigt werden. Auch die Entmethylierung und die Isolierung des Reaktionsproduktes (IXb) als Reineckat entsprach völlig dem Modellversuch. Nach den Analysen des Reineckats und des Chloroaurats (Schmelzp. 148° unter Zers.), sowie dem guten Reduktionsvermögen des Chlorids war auch hier die Einwirkung des Jodwasserstoffs nicht zu weit gegangen.

Die *pharmakologische Prüfung*[5]) der synthetischen α-Amino-β-oxy-aldehyde und ihrer Methyläther erfolgte nach der

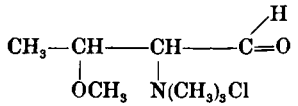
---

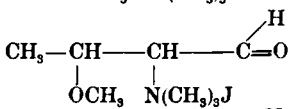
[1]) A. ch. (10) **9**, 407 (1928) und **10**, 147 (1928).
[2]) Bl. (4) **53**, 38 (1933). [3]) B. **64**, 30 (1931); **66**, 665 (1933).
[4]) B. **67**, 269, 1736, 1762 (1934).
[5]) Für wertvolle Unterstützung und Hilfe sind wir Herrn Prof. Dr. Bijlsma sowie den Herren Dr. le Heux und Dr. van Dorssen vom Pharmakologischen Institut der Rijksuniversität Utrecht sehr zu Dank verpflichtet.

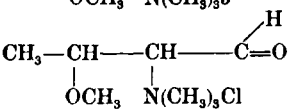
Führnerschen Methode am isolierten Froschherz, wobei die in unserer 1. Mitteilung genannten Versuchsbedingungen eingehalten wurden.

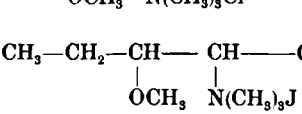
Bei den Methyläthern wurde beim Derivat des Butyraldehyds außer dem Jodid auch das durch Austausch mit Silberchlorid dargestellte Chlorid getestet, um zu prüfen, ob das Jodion einen spezifischen Einfluß besaß. Wegen der strukturellen Beziehungen haben wir zu Vergleichszwecken auch Glucosamin-hydrochlorid auf Muscarinwirkung untersucht.

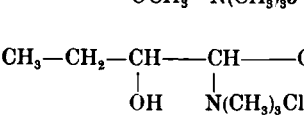
Die Auswertungen hatten folgendes Ergebnis:

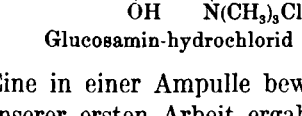

5200 MWE pro g


3800 MWE pro g


8600 MWE pro g


unwirksam


4300 MWE pro g


Glucosamin-hydrochlorid — 200 MWE pro g

Eine in einer Ampulle bewahrte Muscarinchlorid-Lösung aus unserer ersten Arbeit ergab bei der neuerlichen Prüfung 160000000 MWE pro g, die Wirksamkeit war also gegenüber dem ursprünglichen Wert (180—200 Millionen MWE pro g) nur wenig zurückgegangen. Im Vergleich zur Aktivität des natürlichen Muscarins sind demnach die bisher beschriebenen synthetischen Produkte als praktisch wirkungslos zu bezeichnen[1]).

[1]) Bei der Auswertung der aus den Reineckaten gewonnenen Chloride beobachteten wir mit höheren Konzentrationen häufig eine Zunahme der Hubhöhe. Wir fanden keinen Anhaltspunkt dafür, daß dies

Auch wenn man berücksichtigt, daß nur einer der Antipoden des racemischen Muscarins hoch wirksam sein dürfte, müßte die Aktivität etwa 25000-mal größer sein, als gefunden wurde.

Das negative Ergebnis konnte natürlich sehr verschiedene Ursachen haben. Die Möglichkeit, daß die Synthese physiologisch unwirksames „Epi-muscarin" geliefert hatte, wird später an der Hand weiterer Versuche noch näher besprochen werden. In diesem Stadium der Arbeit erhob sich in erster Linie die Frage, ob die Struktur des Muscarins wirklich Formel I entsprach, die wir für wahrscheinlicher gehalten hatten als II mit „Isoserin-Stellung" der Substituenten. Abgesehen von der möglichen Beziehung zu natürlichen Oxyaminosäuren sprach vor allem die auffällige Alkalibeständigkeit zugunsten eines Derivates des einfachen Betainaldehyds. Ein sehr auffälliger Unterschied zwischen der natürlichen Verbindung und unseren synthetischen Stoffen ist bei der Probe mit fuchsinschwefliger Säure festzustellen; während Muscarin hierbei ziemlich rasch eine sehr charakteristische Reaktion gab, trat bei den synthetischen Verbindungen höchstens nach längerem Stehen eine Färbung auf. Zum Vergleich haben wir die Farbreaktion beim quaternären (Trimethyl)-ammoniumjodid von α-Amino-butyraldehyd[1]) und bei α-Oxy-butyraldehyd[2]) untersucht. Während letzterer mit fuchsinschwefliger Säure die charakteristische Färbung gab, zeigte das Jodid der quaternären Aldehydbase keinerlei Reaktion. Wir sahen uns daher veranlaßt, nunmehr vor allem die Synthese der strukturisomeren Verbindungen in Angriff zu nehmen.

---

durch Spuren von Bariumsalzen verursacht wurde; möglicherweise handelt es sich um eine nicotinartige Wirkung, wie sie nach H. H. Dale und A. J. Ewins [J. of Physiol. 48, XXIV (1924); Biochem. J. 8, 209 (1914); J. Pharm. exp. Ther. 6, 147 (1914)] allen quaternären Ammoniumbasen eigen ist.

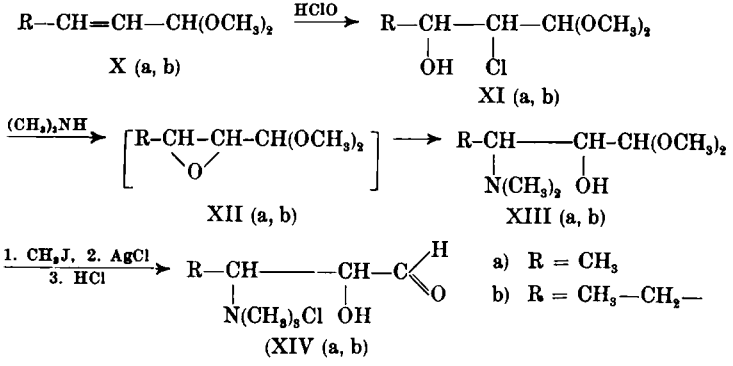
[1]) Vgl. Fußnote 5, S. 4.

[2]) α-Oxy-butyraldehyd wurde nach E. Dworzak u. J. Pierri [M. 52, 141 (1929)] dargestellt, ferner aus Diäthoxy-essigsäure-piperidid und Äthyl-magnesium-jodid, entsprechend der Synthese des Milchsäurealdehyds nach A. Wohl und M. Lange, B. 41, 3612 (1909).

II. Synthese entsprechender Aldehydbasen mit „Iso-serin-Stellung" der Substituenten.

(Weg über α,β-Epoxyverbindungen.)

In der Einleitung zu den unter I beschriebenen Synthesen wurde bereits auf die Darstellung des α-Oxy-β-amino-propionaldehyd-acetals nach A. Wohl[1]) und H. Schweitzer hingewiesen, wobei offensichtlich ein Äthylenoxyd als Zwischenprodukt auftritt. In analoger Weise haben wir für den Modellversuch in der C_4-Reihe unterchlorige Säure an Crotonaldehyd-dimethylacetal (Xa) addiert und das Chlorhydrin (XIa) in Methanollösung unter Zusatz von Natriumjodid[1]) auf 100° erhitzt. Die Reaktion verlief sichtlich ebenso wie die von A. Wohl beschriebene Umsetzung; es konnte nur *eine* Acetalbase isoliert werden, die in guter Ausbeute entstanden war.



Um die Konstitution des Acetals XIIIa sicher zu stellen, wurde es mit Salzsäure verseift, der Aldehyd mit Bromwasser zur entsprechenden Carbonsäure oxydiert und diese mit Bleitetraacetat abgebaut. Acetal XIIIa gab mit Methyljodid ein quaternäres Jodid, das ebenso wie das entsprechende Chlorid keine Neigung zur Krystallisation zeigte. Aus letzterem konnte jedoch ein krystallisiertes Chloroaurat gewonnen werden; dieses besaß den richtigen Goldgehalt. Aus dem quaternären Chlorid des Acetals erhielten wir durch Behandlung mit kalter konz.

[1]) A. Wohl und Mitarbeiter, B. 39, 1951 (1906) u. 40, 92 (1907).

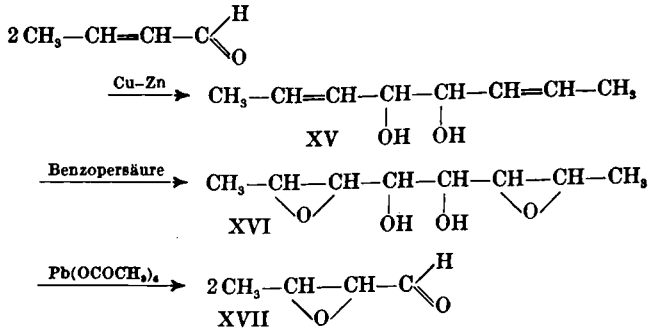
Salzsäure und Eindunsten im Vakuum über konz. H_2SO_4 den freien Aldehyd XIVa; dieser bildete einen hellgelben Sirup, der Fehlingsche Lösung bereits in der Kälte reduzierte. Die Reaktion mit fuchsinschwefliger Säure war zwar nicht so intensiv als bei α-Oxy-butyraldehyd selbst; in ziemlich konz. Lösungen trat die Färbung jedoch recht rasch auf, nicht erst nach langem Stehen wie bei IXa. Das Reineckat und auch das Chloroaurat von XIVa konnte nur mikrokrystallin erhalten werden; letzteres schmolz bei 195—196° unter Zers., also viel höher als jenes von IXa. Die Analysen des Goldsalzes stimmten vorzüglich mit den berechneten Werten überein.

Das für die entsprechende Synthese in der *Pentanreihe* benötigte α,β-Pentenal-diäthylacetal wurde analog der Vorschrift von F. G. Fischer[1]) und K. Löwenberg aus n-Valeraldehyd gewonnen. Die Addition der unterchlorigen Säure an das Acetal verlief äußerst langsam, wahrscheinlich wegen seiner geringen Löslichkeit in Wasser. Aus diesem Grunde ließ die Ausbeute an Chlorhydrin zu wünschen übrig, auch fanden wir durch die Zersetzung der unterchlorigen Säure häufig einen zu hohen Chlorgehalt. Beim *Dimethyl*acetal verlief die Addition erheblich rascher, aber doch noch viel langsamer als beim Crotonaldehyd-dimethylacetal. Die Umsetzung der Chlorhydrine mit methylalkoholischer Dimethylaminlösung entsprach den Erwartungen. Zur Kontrolle haben wir auch hier die Formel XIII entsprechende Säure mit Bleitetraacetat abgebaut. Die weiteren Umsetzungen zu XIVb verliefen ebenso wie bei den Derivaten des Butyraldehyds. Auch die Aldehydreaktionen des Endprodukts waren analog; während das Reineckat wiederum mikrokrystallin ausfiel, konnte jedoch das Chloroaurat nicht deutlich krystallin erhalten werden. Der Zersetzungspunkt war schwankend (etwa 175—180°), dagegen fanden wir bei den verschiedenen Präparaten stets den richtigen Goldgehalt.

Es schien wünschenswert, die Aldehydbasen dieses Typs auch ohne Verwendung der Acetale unmittelbar aus den

[1]) B. **64**, 30 (1931); **66**, 665 (1933).

α,β-Epoxy-aldehyden darzustellen. Für die Gewinnung der letzteren sollte die nachstehende Reaktionsfolge dienen:



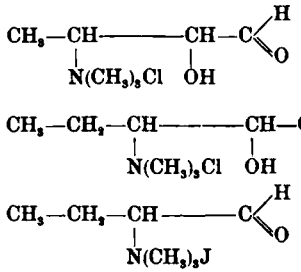
Während Dipropenylglycol XV nach dem Verfahren von E. Charon[1]) leicht zugänglich ist, konnten nach der Benzopersäure-Oxydation nur sehr bescheidene Mengen an Verbindung XVI isoliert werden. Herr P. J. van der Laan, der sich in unserem Laboratorium mit der Ausarbeitung obigen Weges beschäftigte, erzielte etwas bessere Ergebnisse, als die Oxydation in einem Gemisch von Äther-Petroläther vorgenommen wurde. Wegen der Flüchtigkeit des 2.3-Epoxybutanals (XVII) erwies es sich für dessen Isolierung als günstig, die Glycolspaltung nicht in Benzol, sondern in Pentanlösung vorzunehmen. Die erhaltene Verbindung war möglicherweise nicht ganz rein; sie zeigte jedoch starkes Reduktionsvermögen und gab mit einer Eisessiglösung von Kaliumjodid Jodabscheidung. Diese Reaktion ist bekanntlich charakteristisch für Verbindungen, die einen Oxydoring in α,β-Stellung zu einer Carbonyl- oder Carboxylgruppe besitzen[2]). In Anbetracht der spärlichen Ausbeute an Verbindung XVII haben wir die weiteren Umsetzungen mit Dimethylamin und mit Methyljodid nur in einem orientierenden Versuch vorgenommen. Die Analysenwerte des hierbei erhaltenen Reineckats entsprachen in der Tat den für das Kation von XIVa erwarteten Werten. In präparativer Hinsicht ist der zuerst beschriebene Weg über

[1]) Ann. chim. (7) **17**, 217 (1899).

[2]) S. Bodforss, Die Äthylenoxyde, Stuttgart **1920**, S. 56.

die Chlorhydrine für die Darstellung der α-Oxy-β-amino-Derivate bei weitem vorzuziehen.

Bei der pharmakologischen Prüfung der synthetischen Aldehydbasen von Abschnitt II erhielten wir folgende Ergebnisse:



Wie man sieht, waren auch die strukturisomeren Verbindungen praktisch unwirksam, während das zum Vergleich untersuchte Jodid des „Äthyl-betain-aldehyds" einige Aktivität zeigte.

III. Einige neue Versuche mit natürlichem Muscarin.

Nachdem die in den beiden vorstehenden Abschnitten beschriebenen Versuche nicht zum gewünschten Erfolg geführt hatten, standen verschiedene Erklärungsmöglichkeiten zur Diskussion. So schien es denkbar, daß die synthetischen Verbindungen physiologisch inaktive Polymere[1]) darstellten und die geringfügige Aktivität auf Spuren der monomeren Form (0,004 Proc.!) zurückzuführen wäre. In Anbetracht des guten Reduktionsvermögens der Präparate durfte dies jedoch als unwahrscheinlich gelten. Wie schon in der Einleitung betont wurde, ist dagegen die Annahme, daß eine der synthetischen Verbindungen ein (racemisches) Epimeres des Muscarins ist, durchaus plausibel. Man weiß von vielen Wirkstoffen, daß die physiologische Aktivität durch scheinbar geringfügige stereochemische Unterschiede häufig tiefer beeinflußt wird als

[1]) Vgl. die monomere und die trimere Form des Betain-aldehydchlorids, R. Voet, Bl. (4) 45, 1016 (1929).

durch manche größere Änderungen am Kohlenstoffskelett. Für die Fortsetzung der synthetischen Arbeit war es sehr erschwerend, daß die bisher bekannten chemischen Eigenschaften des Muscarins nach wie vor keine zuverlässige Entscheidung erlaubten, ob die Substituenten in Serin- oder in Isoserin-Stellung angeordnet sind. Es schien sehr wünschenswert, diese Frage durch einige neue Versuche mit natürlichem Muscarin zu klären.

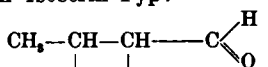
Wir haben daher neuerdings Muscarin isoliert, und zwar kamen 100 kg frische Fliegenpilze zur Verwendung, die im Herbst 1936 in der Provinz Utrecht gesammelt wurden. Die Aufarbeitung erfolgte völlig entsprechend den früher gemachten Erfahrungen; wir erhielten 125 mg Muscarin-Reineckat bzw. 50 mg des Chlorids. Das neue Präparat zeigte eine Aktivität von 160—170 Millionen MWE pro g, war also etwas schwächer wirksam als jenes vom Jahre 1931; auch die Analysen wiesen noch auf eine geringe Beimischung hin. Wir haben jedoch davon abgesehen, die Ausbeute an dem kostbaren Material durch weiteres Umkrystallisieren zu schmälern, zumal der Reinheitsgrad für die uns interessierenden Versuche ausreichend schien, und wir überdies auch ein Chloroaurat darstellten, das den richtigen Goldgehalt aufwies.

Eine Lücke bei der Ableitung der Konstitution des Muscarins ist das Fehlen einer Molekulargewichtsbestimmung, da die Zusammensetzung des Kations $[C_8H_{18}O_2N]^+$ nur den einfachsten Ausdruck für die Analysenergebnisse darstellt. An und für sich erscheint ein quaternäres Ammoniumchlorid für eine Molekulargewichtsbestimmung sehr ungeeignet. R. Voet[1]) hat jedoch für das Hydrochlorid des Betain-aldehyds in Eisessig nach der kryoskopischen Methode sehr befriedigende Werte erhalten; offensichtlich tritt also in Eisessiglösung keine nennenswerte Dissoziation in Ionen auf. Nachdem wir mit dieser Methode bei einigen Testsubstanzen ebenfalls brauchbare Werte bekamen, wurde sie auch bei Muscarin-chlorid angewandt. Durch den hygroskopischen Charakter des Chlorids und die Gefahr einer Verunreinigung durch Spuren anorganischer Salze

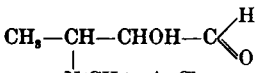
[1]) Bl. [4] 45, 1016 (1929).

bei der Darstellung aus dem Reineckat sind die Bestimmungen nur als halbquantitativ zu werten, obschon wir uns bemühten, die Fehlerquellen nach Möglichkeit einzuschränken. Die Genauigkeit war aber sicherlich genügend groß, um zwischen der monomeren Form (Mol.-Gew. 195,5) und einem Vielfachen — z. B. dem bei einem Aldehyd sehr in Betracht kommenden Trimeren — zu entscheiden. Die gefundenen Werte von 136 und 190 sprechen eindeutig zugunsten der einfachen Formel. Hiermit ist zugleich der eventuelle Einwand widerlegt, daß die Dioxy-valeriansäure beim Hofmannschen Abbau aus irgendeinem strukturell viel komplizierteren Molekül entstanden sei.

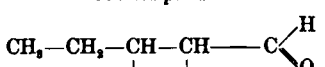
Bei unserer früheren Untersuchung war das *Chloroaurat des Muscarins* nur herangezogen worden, um durch Bestimmung des Goldgehaltes die von den Analysen der Reineckate abgeleitete Bruttoformel zu kontrollieren. Nun war es uns aufgefallen, daß die Chloroaurate der synthetischen Oxy-betainaldehyde mit Serin-Stellung der Substituenten einen viel niedrigeren Zersetzungspunkt aufwiesen als die Verbindungen vom Isoserin-Typ:



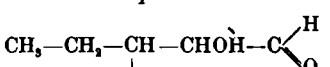
Schmelzp. 116°



Schmelzp. 195—196°



Schmelzp. 148°



Schmelzp. 175—180°

Während die Schmelzpunkte der Chloroaurate von quaternären Ammoniumbasen — auch bei Derivaten von Aminoalkoholen und Aminosäuren — etwa zwischen 180 und 250° gefunden werden, liegen jene der Chloroaurate von Betain-aldehyden anscheinend allgemein niedriger. So zeigte auch das neu dargestellte, von der α-Amino-buttersäure abgeleitete Betain-aldehyd-chloroaurat $CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH \cdot [N(CH_3)_3 \cdot AuCl_4] \cdot C{\overset{H}{=}}O$ einen Schmelzpunkt von 120°. Für das in glänzenden Blättchen krystallisierende Chloroaurat des Muscarins fanden wir einen

Schmelzpunkt von 115—117°. Das Derivat gehört also zu den niedrig schmelzenden Chloroauraten; wir sehen hierin eine wichtige neue Stütze für die Annahme, daß die Stellung der Substituenten im Muscarin dem Serin-Typ entspricht.

Es wurden noch verschiedene Versuche über Oxydation der Reduktionsprodukte des Muscarins und der synthetischen Verbindungen mit Bleitetraacetat ausgeführt; ferner haben wir letztere dem Hofmannschen Abbau unterworfen. Wir möchten jedoch hier von einer Beschreibung der betreffenden Versuche absehen, da diese noch in mancher Hinsicht ergänzungsbedürftig sind.

Bereits in diesem Stadium der Untersuchung liegen Betrachtungen über die Konfiguration des Muscarins und seine Beziehungen zu Threonin und Allo-threonin nahe. Es ist jedoch zweckmäßiger, diese Verhältnisse erst in einer folgenden mit Herrn Dr. P. J. van der Laan ausgeführten Arbeit zu diskutieren.

Experimenteller Teil.

Versuche zu Abschnitt I.

α-Brom-β-methoxy-butyraldehyd.

25 g Crotonaldehyd wurden in einer Mischung von 150 ccm Methanol und 50 ccm Wasser gelöst, die Lösung in einer mit Glasschliffen versehenen Apparatur auf etwas unter 0° abgekühlt und mit Hilfe eines Stickstoffstromes Bromdampf eingeleitet. Die Zufuhr wurde so geregelt, daß die Reaktionslösung nach etwa einer Stunde eine starke, nicht mehr von selbst verschwindene Gelbfärbung zeigte. Der Überschuß an Brom wurde durch einige Tropfen Crotonaldehyd weggenommen und die Flüssigkeit in 1 Liter gesättigte Kochsalzlösung gegeben; das ölige Reaktionsprodukt wurde in Äther aufgenommen (4-mal 100 ccm), die Ätherlösung mit $NaHCO_3$-Lösung ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und eventuell nach Vereinigung mit der entsprechenden Lösung aus Parallelversuchen zur Trockne gedampft.

Durchschnittlich wurden pro Ansatz 57 g Brom aufgenommen. Wenn die Addition länger als 1 Stunde dauerte

oder das Rohprodukt erst nach einiger Zeit aufgearbeitet wurde, entstanden verhältnismäßig mehr Stoffe mit zu hohem Bromgehalt, so daß zur Abtrennung des reinen α-Brom-β-methoxyaldehyds häufiger fraktioniert werden mußte. Anfänglich haben wir von den bei der Destillation erhaltenen Fraktionen jeweils Brom- und Methoxylgehalt bestimmt, um das an Brommethoxyaldehyd reichste Destillat festzustellen. Die verschiedenen Aufarbeitungen lieferten jedoch sehr gut übereinstimmende Ergebnisse, so daß später nur mehr die Endprodukte analytisch kontrolliert werden mußten. Wir fanden bei den niedrig siedenden Anteilen stets den höchsten Bromgehalt (Dibromide), während der Nachlauf hauptsächlich aus dem Acetal des Brommethoxyaldehyds bestand.

Beispiel für eine Fraktionierung von 400 g Rohprodukt:

		Siedetemp.	Badtemp.	mm Druck	g Gewicht
1. Destillation	a) Vorlauf	bis 50°	80°	0,35	25
	b) Hauptfraktion	50–60°	80°	0,35	**230**
	c) Nachlauf	70–72°	100°	0,35	125
2. Destillation von 1b)	a) Vorlauf	bis 47°	80°	0,9	
	b) Hauptfraktion	47–52°	80°	0,9	**150**
3. Destillation von 2b) (mit Frakt.-Aufsatz)	a) Vorlauf	bis 56°	90–100°	1,8	
	b) Hauptfraktion	56–57°	90–100°	1,8	**100**
4. *Destillation von 3b)* (mit Frakt.-Aufsatz)	a) Vorlauf	bis 56°	100°	1,8	
	b) Hauptfraktion	56,5°	100°	1,8	**60**

Die Ausbeute an 4b) könnte durch weitere Fraktionierung des Nachlaufs noch erhöht werden; wir haben die Destillation stets abgebrochen, sobald Schlierenbildung bemerkbar wurde. Fraktion 4b), welche zu Tränen reizt, zeigte starkes Reduktionsvermögen und gab bei den, von verschiedenen Aufarbeitungen stammenden Analysen[1]) befriedigende Werte:

4,962, 4,775, 4,757 mg Subst.: 5,985, 5,740, 5,705 mg CO_2, 2,250, 2,120, 2,170 mg H_2O. — 3,228, 3,296, 13,106 mg Subst.: 1,430, 1,455 mg Br,

[1]) Die Mehrzahl der Mikroanalysen wurden im Laboratorium von Herrn Dr. Schoeller, Berlin, ausgeführt; vereinzelte Analysen stammen von Herrn P. J. Hubers, Amsterdam.

13,870 mg AgBr. — 3,476, 4,281, 3,178 mg Subst.: 4,160, 5,320, 3,840 mg AgJ.

$C_5H_9O_2Br$ (181)	Ber.	C 33,15	H 4,97	Br 44,20	OCH_3	17,13
	Gef.	„ 32,90	„ 5,04	„ 44,31	„	15,78
		„ 32,78	„ 4,93	„ 44,14	„	16,39
		„ 32,71	„ 5,07	„ 45,05	„	15,94.

Die etwas zu niedrigen Methoxylwerte, welche bei eigenen Bestimmungen ebenso wie bei Analysen von Dr. Schoeller erhalten wurden, dürften durch die Flüchtigkeit des Brom-methoxy-aldehyds verursacht sein.

Für den *Konstitutionsbeweis* wurden 5 g Brom-methoxy-butyraldehyd mit einer Lösung von 2,7 g $K_2Cr_2O_7$ und 2,5 ccm konz. H_2SO_4 in 25 ccm Wasser versetzt. Die Lösung, welche sich zunächst von selbst stark erwärmte, wurde dann 15 Minuten gekocht und nach dem Abkühlen mit Äther ausgeschüttelt. Nach der üblichen Aufarbeitung erhielten wir bei der Destillation 1,3 g Vorlauf (unveränderter Aldehyd), hernach 0,9 g eines Produktes vom Siedep.$_{1,4\ mm}$ 115—120°, das beim Abkühlen krystallisierte. Nach Waschen mit Petroläther wurde 2-mal aus wenig Benzol umkrystallisiert. Schmelzp.[1]) 60°.

4,949 mg Subst.: 5,510 mg CO_2, 2,060 mg H_2O. — 3,61 mg Subst.: 1,289 mg Br, 0,010 mg Rückstand.

α-Brom-β-methoxybuttersäure.

$C_5H_9O_3Br$ (197)	Ber.	C 30,46	H 4,56	Br 40,61
	Gef.	„ 30,36	„ 4,62	„ 40,92.

Bei einem anderen Versuch wurde die Säure durch Oxydation mit der berechneten Menge $KMnO_4$-Lösung gewonnen, wobei sie in besserer Ausbeute entstand. Zur Abspaltung von HBr haben wir 1 g α-Brom-β-methoxy-buttersäure mit einer Lösung von 2 g KOH in 12 ccm absolutem Alkohol 6 Stunden auf 110° erhitzt. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft, der feste Rückstand in Wasser aufgenommen, die Lösung mit Tierkohle entfärbt, nach Abkühlen mit 4 n-H_2SO_4 angesäuert und rasch ausgeäthert. Nach der üblichen Aufarbeitung erhielten wir 272 mg eines Krystallisats vom Schmelzp. 128,5°, übereinstimmend mit jenem der *β-Methoxy-crotonsäure*. Zur Identifizierung wurden 220 mg der erhaltenen Säure mit

[1]) Die Schmelzpunkte der Arbeit sind nicht korrigiert.

10 ccm 2 n-H_2SO_4 auf 100° erhitzt und nach Beendigung der CO_2-Abspaltung etwa 1 ccm Flüssigkeit überdestilliert. Aus dem Destillat erhielten wir mit Dinitro-phenylhydrazin ein Krystallisat, das nach Schmelzpunkt (124—125°) und Mischschmelzpunkt mit Aceton-dinitro-phenylhydrazon identisch war.

α-Dimethyl-amino-β-methoxy-n-butyraldehyd.

In einen mit Tropftrichter und $CaCl_2$-Rohr versehenen Erlenmeyer-Kolben wurden 30 g einer 33-proc. Lösung von Dimethylamin in Äther gebracht und nach Abkühlen auf —15° tropfenweise eine Lösung von 15 g α-Brom-β-methoxy-n-butyraldehyd in 15 ccm Äther zugefügt. Es entstand alsbald ein Niederschlag von Dimethylamin-hydrobromid. Der Kolben wurde dann gut verschlossen 2—3 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Hernach haben wir die hellgelbe Lösung abdekantiert, den Rückstand mit Äther ausgewaschen und die vereinigten Ätherlösungen zur Trockne gedampft. Das zurückbleibende gelbbraune Öl wurde unter Kühlung mit 6 n-HCl angesäuert und zur Entfernung nicht basischer Begleitstoffe mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Hierauf haben wir die Lösung durch Zugabe von festem K_2CO_3 (ebenfalls unter Kühlung) alkalisch gemacht und 5-mal mit Äther ausgezogen. Dieser Extrakt lieferte nach der üblichen Aufarbeitung und der Vakuumdestillation 5,4 g einer gelben Flüssigkeit vom Siedep. 33—38° (bei 0,5 mm). Da das Produkt noch eine schwach positive Beilstein-Reaktion gab, wurde es noch einmal wie vorhin in saurer und K_2CO_3-alkalischer Lösung fraktioniert. Die Destillation lieferte dann ein bromfreies Produkt (Siedep. 34—35° bei 0,6 mm), das stark reduzierte und einen betäubenden Geruch besaß. Der Methoxylwert wurde auch hier zu niedrig gefunden, während die übrigen Werte auf die richtige Zusammensetzung weisen.

4,776 mg Subst.: 10,090 mg CO_2, 4,400 mg H_2O. — 3,565 mg Subst.: 0,303 ccm N_2 (21,5°, 761 mm). — 3,927 mg Subst.: 5,195 mg AgJ.

$C_7H_{15}O_2N$ (145,1)	Ber.	C 57,93	H 10,34	N 9,66	OCH_3 21,38
	Gef.	„ 57,62	„ 10,24	„ 9,86	„ 17,45.

Quaternäres (Trimethyl-)ammoniumjodid von α-Amino-β-methoxy-n-butyraldehyd.

0,5 g α-Dimethylamino-β-methoxy-n-butyraldehyd wurden in 2 ccm absolutem Methanol gelöst und 5 ccm Methyljodid zugefügt. Nachdem sich die Lösung von selbst erwärmt hatte, wurde auf dem Wasserbad kurz zum Sieden erhitzt und dann mit Äther gefällt. Das farblose Reaktionsprodukt (0,844 g vom Schmelzp. 160°) lieferte beim Umkrystallisieren aus Alkohol Prismen vom Schmelzp. 160—161°. Das Salz reduzierte Fehlingsche Lösung, gab jedoch mit fuchsinschwefliger Säure keine oder erst nach längerer Zeit eine geringfügige Färbung.

5,400 mg Subst.: 6,600 mg CO_2, 3,000 mg H_2O, 0,008 mg Rückst. — 3,128 mg Subst.: 0,125 ccm N_2 (22°, 765 mm). — 11,302 mg Subst.: 9,275 mg AgJ.

$C_8H_{18}O_2NJ$ (287,1)	Ber.	C 33,45	H 6,27	N 4,88	J 44,36
	Gef.	„ 33,38	„ 6,18	„ 4,88	„ 44,25.

Quaternäres (Trimethyl-)ammoniumchlorid von α-Amino-β-methoxy-n-butyraldehyd.

200 mg des Jodids wurden in 5 ccm absolutem Alkohol gelöst und mit 100 mg frisch dargestelltem AgCl 2 Stunden geschüttelt. Nach Abfiltrieren des gelben Silberhalogenids (169 mg) wurde die alkoholische Lösung stark eingeengt, mit 50 ccm absolutem Äther versetzt und mehrere Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Das abgeschiedene quaternäre Ammoniumchlorid krystallisiert in Nadeln vom Schmelzp. 130° (nach Sintern bei 125°); diese sind sehr hygroskopisch. Das zunächst ölige Chloroaurat wurde rasch krystallin; nach Umkrystallisieren aus Wasser zeigte es einen Schmelzpunkt von 79—80°.

1,208, 3,022 mg Subst.: 0,483, 1,195 mg Au.

$C_8H_{18}O_2NCl_4Au$ (499,2)	Ber.	Au 39,50
	Gef.	„ 39,98, 39,54.

Salze der quaternären (Trimethyl-)ammoniumbase von α-Amino-β-oxy-n-butyraldehyd.

a) *Reineckat.* 100 mg des quaternären Ammoniumjodids wurden in einer Mikro-Zeisel-Apparatur mit 1,5 ccm HJ (Merck, s = 1,7) lang-

sam auf 120° (Badtemp.) erwärmt. Nachdem sich die alkoholische $AgNO_3$-Lösung zu trüben begann, wurde die Temperatur 15 Minuten auf 125° gehalten, wonach sich die über der Fällung befindliche Flüssigkeit gerade wieder geklärt hatte. Der AgJ-Niederschlag wog 75 mg (theor. 82 mg), so daß die Entmethylierung also zu etwa 90 Proc. abgelaufen war. Die etwas dunkler gewordene, aber klare HJ-Lösung wurde nach Abkühlen mit 5 ccm Wasser verdünnt und mit Reinecke-Salz[1]) (1,5 g in 50 ccm Wasser) gefällt. Das gut durchkrystallisierte Reineckat (160 mg, theor. 162 mg) wurde in wenig Aceton gelöst und bis zur beginnenden Krystallisation mit Wasser versetzt; bei langsamer Krystallisation (mit wenig Wasser) entstanden Rauten, bei rascher (mit viel Wasser) dagegen lange Nadeln.

Analysen (von drei verschiedenen Präparaten):

5,076, 5,002, 5,389 mg Subst.: 5,200, 5,100, 5,480 mg CO_2, 2,190, 2,090, 2,220 mg H_2O und 0,841, 0,848 mg Rückstand (Cr_2O_3), 3,025, 2,973, 2,923 mg Subst.: 0,547, 0,519, 0,517 ccm N_2 (25, 22, 24°, 757, 765, 765 mm).

$C_{11}H_{22}O_2N_7S_4Cr$ (464,5)	Ber.	C 28,45	H 4,74	N 21,12	Cr 11,21
	Gef.	„ 27,94	„ 4,97	„ 20,63	„ 11,33
		„ 27,87	„ 4,64	„ 20,33	„ 11,60
		„ 27,73	„ 4,58	„ 20,43.	

b) *Chloroaurat.* Das Reineckat (300 mg) setzten wir entsprechend dem Verfahren von J. Kapfhammer[2]) und C. Bischoff in das Chlorid um, indem zunächst zu seiner Lösung in 20 ccm Aceton–Wasser (1 : 1) 20 ccm Ag_2SO_4-Lösung (6 g pro Liter) zugesetzt wurden. Nach Abfiltrieren und Auswaschen des Silber-Reineckats gaben wir zum Filtrat 8,98 ccm $BaCl_2$-Lösung (2,563 g $BaCl_2.2H_2O$ pro 250 ccm), entfernten $BaSO_4$ mit Hilfe eines Asbestfilters und dampften das Filtrat bei 45° i. V. ein. Der Rückstand wurde in Alkohol aufgenommen und die Lösung nach Filtrieren neuerdings abgedampft. Das zurückbleibende Öl wurde beim Aufbewahren im Kühlschrank teilweise krystallin, die Krystalle waren jedoch sehr hygroskopisch. Hinsichtlich der Reaktionen mit Fehlingscher Lösung und mit fuchsinschwefliger Säure verhielt sich das Chlorid ebenso wie das oben beschriebene Jodid des Methoxy-aldehyds.

20 mg des Chlorids wurden in 0,5 ccm Wasser gelöst und eine 30-proc. $AuCl_3$-Lösung zugesetzt. Das Chloroaurat krystallisierte in unscharf begrenzten Blättchen vom Schmelzp. 116° (unter Zers.).

2,155, 3,105 mg Subst.: 0,884, 1,286 mg Au.

$C_7H_{16}O_2NCl_4Au$ (485,2) Ber. Au 40,62 Gef. Au 41,02, 41,01.

[1]) Dargestellt nach H. **189**, 8 (1930).
[2]) H. **191**, 182 (1930).

α-Brom-β-methoxy-n-valeraldehyd.

20 g α,β-*Pentenal*[1]) wurden in 70 ccm Methanol gelöst, 30 ccm Wasser zugesetzt und unter Kühlung auf -2^0 im Laufe von 15 Minuten 26 g Bromdampf eingeleitet, wie beim niedrigen Homologen näher beschrieben worden ist. Nach Eingießen in gesättigte Kochsalzlösung wurde 3-mal mit Äther ausgezogen, die Lösung mit $NaHCO_3$-Lösung ausgeschüttelt und dann über Na_2SO_4 getrocknet.

		Siede-temp.	Bad-temp.	mm Druck	g Gewicht
1. Destillation	a) Vorlauf	bis 70°	110°	1,5	
	b) Hauptfraktion	70–75°	110°	1,5	19,4
2. Destillation von 1b)	a) Vorlauf	bis 65°	90°	1,2	
	b) Hauptfraktion	65–68°	90°	1,2	10,4
3. Destillation von 2b	a) Vorlauf	bis 58°	80°	1,8	
	b) Hauptfraktion	58–60°	80°	1,8	7
4. Destillation von 3b)	a) Vorlauf	bis 58°	80°	0,85	
	b) Hauptfraktion	58–60°	80°	0,85	5

Wie wir auch bei Wiederholungen beobachteten, färbte sich Fraktion 1b) ziemlich rasch blau. Bei der weiteren Fraktionierung wurde diese Blaufärbung weniger ausgeprägt, aber erst Fraktion 4b) blieb auch bei längerem Stehen farblos.

Analysen (Präparate von verschiedenen Aufarbeitungen).

4,972, 4,690 mg Subst.: 6,650, 6,310 mg CO_2, 2,480, 2,300 mg H_2O. — 18,491, 10,764 mg Subst.: 18,095, 10,320 mg AgBr. — 2,949 mg Subst.: 3,115 mg AgJ.

$C_6H_{11}O_2Br$ (195,0)	Ber.	C 36,92	H 5,64	Br 41,03	OCH_3	15,94
	Gef.	„ 36,48	„ 5,54	„ 41,64	„	13,95
		„ 36,69	„ 5,45	„ 40,80.		

α-Dimethylamino-β-methoxy-n-valeraldehyd.

In gleicher Weise wie für das Derivat des Butyraldehyds beschrieben ist, wurden 5 g α-Brom-β-methoxy-n-valeraldehyd in 5 ccm Äther gelöst und unter Eiskühlung tropfenweise zu 15 g einer 33-proc. Lösung von Dimethylamin in Äther gefügt. Das Reaktionsgemisch, in welchem sich alsbald ein farbloser

[1]) Vgl. Fußnoten 1 und 2, S. 7.

Niederschlag bildete, wurde 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt und dann die Lösung abdekantiert und der Bodenkörper mit Äther nachgewaschen. Die Ätherlösung haben wir eingedampft, den Rückstand unter Kühlung in Salzsäure aufgenommen und die Lösung mit Äther ausgeschüttelt. Hierauf wurde mit K_2CO_3 alkalisch gemacht und wiederum mit Äther extrahiert. Bei der üblichen Aufarbeitung erhielten wir 0,9 g Aldehydbase vom Siedep. 40—42° bei 0,4 mm. Dieses Produkt war stets noch etwas bromhaltig; wir haben jedoch in dieser Stufe auf eine weitere Reinigung verzichtet, da diese ohne besondere Verluste durch Umkrystallisieren des quaternären Ammoniumjodids zu erreichen war.

Quaternäres (Trimethyl-)ammoniumjodid von α-Amino-β-methoxy-n-valeraldehyd.

0,9 g des Dimethylamino-aldehyds wurden in 2 ccm Methanol gelöst und 3 ccm Methyljodid zugesetzt. Das Reaktionsgemisch haben wir ebenso behandelt, wie beim niedrigen Homologen beschrieben ist. Das gelbe Rohprodukt (0,9 g vom Schmelzp. 115°) wurde mit 3 ccm absolutem Alkohol bei 0° geschüttelt; hierauf konnten 0,62 g eines farblosen Produktes vom Schmelzp. 160—165° abfiltriert werden, während sich aus der gelben Mutterlauge durch Zusatz von Äther nur eine ölige Fällung abschied, die schwierig zur Krystallisation zu bringen war. Die farblose Hauptfraktion wurde mit 4 ccm absolutem Alkohol erwärmt und vom Ungelösten abfiltriert. Aus der Lösung krystallisierten 300 mg des Jodids aus, die noch 3-mal aus Alkohol umkrystallisiert wurden. Ausbeute 130 mg vom Schmelzp. 186—187° (unter Zers.). Bei langsamem Auskrystallisieren erschienen gut ausgebildete Rauten. Fehlingsche Lösung wurde reduziert, dagegen gab fuchsinschweflige Säure keine einwandfreie Farbreaktion.

4,798 mg Subst.: 6,305 mg CO_2, 2,850 mg H_2O. — 3,618, 3,385 mg Subst.: 0,138, 0,128 ccm N_2 (25, 23°, 760, 762 mm). — 7,687, 8,710 mg Subst.: 5,955, 6,880 mg AgJ.

$C_9H_{20}O_2NJ$ (301,1)	Ber.	C 35,88	H 6,64	N 4,65	J 42,18
	Gef.	„ 35,84	„ 6,60	„ 4,37	„ 41,87
				„ 4,37	„ 42,70.

Salze der quaternären (Trimethyl-)ammoniumbase von α-Amino-β-oxy-n-valeraldehyd.

a) *Reineckat.* 50 mg des quaternären Jodids wurden, wie beim Derivat des Butyraldehyds beschrieben, im Mikro-Zeisel-Apparat 15 Minuten mit 1,5 ccm HJ (1,7) auf 125° erwärmt. Theoretisch waren 39 mg AgJ zu erwarten; gefunden wurden 33 mg, die Entmethylierung hatte also zu 84 Proc. stattgefunden. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser verdünnt und mit einem Überschuß an Reinecke-salz gefällt. Der Niederschlag (68 mg, theor. 80 mg) bestand aus Prismen und unvollständig ausgebildeten Rauten. Nach Umkrystallisieren aus Aceton–Wasser erhielten wir (mit viel Wasser) wiederum Nädelchen, bei langsamer Krystallisation (mehr Aceton) dagegen ausschließlich Rauten.

4,071, 5,185 mg Subst.: 4,555, 5,750 mg CO_2, 1,880, 2,420 mg H_2O, 0,643, 0,836 mg Rückstand (Cr_2O_3). — 2,953, 3,242 mg Subst.: 0,499, 0,562 ccm N_2 (21, 25°, 770, 763 mm).

$C_{12}H_{24}O_2N_7S_4Cr$ (478,5)	Ber.	C	30,13	H	5,02	N	20,50	Cr 10,88
	Gef.	„	30,52	„	5,13	„	19,88	„ 10,81
		„	30,24	„	5,18	„	19,93	„ 11,03.

b) *Chloroaurat.* 22 mg Reineckat wurden in 2 ccm Aceton–Wasser (1 : 1) gelöst und 1,3 ccm Ag_2SO_4-Lösung zugefügt. Nach Entfernung des Silber-Reineckats wurden 0,58 ccm $BaCl_2$-Lösung (vgl. oben) zugesetzt und $BaSO_4$ abfiltriert. Den nach Eindampfen des Filtrats erhaltenen Rückstand haben wir in 1 ccm Wasser aufgenommen und langsam 30-proc. $AuCl_3$-Lösung zugegeben. Das Chloroaurat schied sich rasch in glänzenden Blättchen aus. Schmelzpunkt nach dem Trocknen 148° (unter Zers.).

2,288, 2,293 mg Subst.: 0,918, 0,919 mg Au.

$C_8H_{18}O_2NCl_4Au$ (499,2)	Ber.	Au 39,50	Gef.	Au 40,12, 40,08.	

Versuche zu Abschnitt II.

α-Chlor-β-oxy-n-valeriansäure.

Zu einer eisgekühlten Lösung von 10 g *α,β-Pentensäure*[1]) in 500 ccm Wasser wurde unter Rühren tropfenweise etwas mehr als die berechnete Menge unterchloriger Säure[2]) gegeben. Bei der üblichen Aufarbeitung erhielten wir etwa 9 g der Chlor-oxy-valeriansäure als viscose Flüssigkeit (Siedep. 139° bei 3 mm), die beim Aufbewahren erstarrt. Schmelzpunkt nach Umkrystallisieren aus Benzol 66°.

[1]) Dargestellt nach K. von Auwers, A. 432, 63 (1923).
[2]) Dargestellt nach A. Wohl, B. 40, 92 (1907).

4,730 mg Subst.: 6,770 mg CO_2, 2,420 mg H_2O.

$C_5H_9O_3Cl$ (152,5)	Ber.	C 39,34	H 5,90
	Gef.	„ 39,03	„ 5,73.

Äthylester. 20 g α-Chlor-β-oxy-n-valeriansäure wurden in 100 ccm absolutem Alkohol gelöst und nach Zusatz von 8 ccm konz. H_2SO_4 5 Stunden gekocht. Die übliche Aufarbeitung lieferte 20 g Ester vom Siedep. 92° bei 2 mm.

0,1684, 0,1235 g Subst.: 0,1368, 0,1003 g AgCl.

$C_7H_{13}O_3Cl$ (180,6) Ber. Cl 19,67 Gef. Cl 20,10, 20,09.

Acetylierung der Säure. 7 g α-Chlor-β-oxy-n-valeriansäure wurde unter Zusatz einiger Tropfen konz. H_2SO_4 mit 12 g Essigsäure-anhydrid einige Minuten erwärmt; nach Ausgießen in Wasser, Ausäthern usw. erhielten wir die acetylierte Säure, die unter Zusatz von Tierkohle aus Alkohol umkrystallisiert wurde. Farblose Krystalle vom Schmelzp. 99°.

4,774 mg Subst.: 7,610 mg CO_2, 2,530 mg H_2O. — 3,284 mg Subst.: 0,602 mg Cl.

$C_7H_{11}O_4Cl$ (194,5)	Ber.	C 43,19	H 5,66	Cl 18,25
	Gef.	„ 43,48	„ 5,89	„ 18,34.

Die Umsetzungen von α-Chlor-β-oxy-n-valeriansäure, des Äthylesters sowie der betreffenden Acetylderivate mit Trimethylamin führten nicht zu einheitlichen Produkten.

Natriumsalz der α,β-Epoxy-n-valeriansäure.

15 g Natrium wurden in 200 ccm Alkohol gelöst, 20 ccm Wasser zugefügt und diese Lösung zu 25 g α-Chlor-β-oxy-n-valeriansäure in 100 ccm Alkohol gegeben. Es bildete sich ein gelblicher Niederschlag, der nach 12 Stunden abfiltriert wurde. Der Bodenkörper bestand aus zwei Schichten; die obere (hauptsächlich Kochsalz) wurde entfernt. Die untere Schicht wurde aus verdünntem Alkohol (100 ccm Alkohol, 1,5 ccm H_2O) umkrystallisiert, bis das Produkt chlorfrei war.

Na-Bestimmung nach Pregl:

3,849, 6,732 mg Subst.: 2,020, 3,467 mg Na_2SO_4.

$C_5H_7O_3Na$ (138,1) Ber. Na 16,67 Gef. Na 16,99, 16,68.

α-Oxy-β-dimethylamino-n-valeriansäure.

a) *Aus α-Chlor-β-oxy-n-valeriansäure.* Hiervon wurden 10 g mit 40 g einer 33-proc. benzolischen Dimethylaminlösung im Einschlußrohr 12 Stunden in einem Wasserbad erhitzt.

Nach Entfernung des ausgeschiedenen Dimethylamin-hydrochlorids haben wir die gelbe Benzollösung i. V. eingedampft; der zurückbleibende braune Sirup kam nach Kratzen zur Krystallisation. Durch zweimaliges Anreiben mit Aceton und Absaugen konnte ein beinahe farbloses Produkt erhalten werden, das hiernach einige Male aus Alkohol umkrystallisiert wurde. Bei langsamer Krystallisation entstehen Rauten vom Schmelzp. 200° (unter Zers.). Die Ausbeute (2,3 g) konnte bei der Wiederholung des Versuchs durch $1^1/_2$-tägiges Erhitzen fast verdoppelt werden.

5,348 mg Subst.: 10,240 mg CO_2, 4,530 mg H_2O. — 3,653 mg Subst.: 0,273 ccm N_2 (21°, 759 mm).

$C_7H_{15}O_3N$ (161,1)	Ber.	C 52,17	H 9,32	N 8,69
	Gef.	„ 51,80	„ 9,35	„ 8,57.

b) *Aus α,β-Epoxy-n-valeriansäure.* 3 g des Natriumsalzes dieser Säure wurden in 15 g einer 33-proc. wäßrigen Dimethylaminlösung gelöst und 20 Stunden im Einschlußrohr auf 100° erhitzt. Zur Entfernung des überschüssigen Amins haben wir nach dem ersten Eindampfen noch zweimal Wasser zugefügt und wiederum abgedampft. Es erübrigt sich, die weitere Aufarbeitung (Behandlung mit verdünnter Salzsäure, Fällung mit Alkohol zur Entfernung von Kochsalz usw.) genauer zu beschreiben, da sie bei einer Wiederholung wohl verbessert werden könnte. Wir erhielten schließlich α-Oxy-β-dimethylamino-n-valeriansäure vom Schmelzp. 199—200°; das Präparat gab mit dem nach a) dargestellten keine Schmelzpunktserniedrigung.

α-Dimethylamino-n-butyraldehyd.

5 g α-Oxy-β-dimethylamino-n-valeriansäure wurden in 25 ccm Eisessig gelöst, leicht erwärmt und unter Ausschluß von Feuchtigkeit im Laufe von 30 Minuten bei gleichzeitigem Durchleiten von CO_2 allmählich 13,75 g Blei-tetra-acetat zugefügt. Hierauf wurde unter guter Kühlung mit Natronlauge alkalisch gemacht und rasch 4-mal mit Äther ausgeschüttelt. Der nach Trocknen über Na_2SO_4 und Abdampfen erhaltene Rückstand gab bei der Destillation 1 g einer farblosen,

betäubend riechenden Flüssigkeit vom Siedep. 44—45° (bei 18 mm), die Fehlingsche Lösung stark reduzierte.

4,993 mg Subst.: 11,335 mg CO_2, 4,980 mg H_2O. — 2,591 mg Subst.: 0,277 ccm N_2 (24,5°, 755 mm).

$C_6H_{13}ON$ (115,1)	Ber.	C 62,61	H 11,30	N 12,17
	Gef.	C 61,91	„ 11,08	„ 12,18.

Quaternäres (Trimethyl)-ammoniumjodid von α-Amino-n-butyraldehyd.

0,28 g α-Dimethylamino-n-butyraldehyd wurden in 2 ccm Methanol gelöst und 1 ccm Methyljodid zugefügt. Nach der Selbsterwärmung des Reaktionsgemischs wurde kurz aufgekocht, abgekühlt und mit absolutem Äther gefällt. Der Niederschlag (0,552 g vom Schmelzp. 184° unter Zers.) ließ sich sehr gut aus absolutem Alkohol umkrystallisieren, in dem er viel weniger löslich ist als die entsprechenden quaternären Jodide mit einer Methoxylgruppe. Schmelzp. 185—186°. Fehlingsche Lösung wurde erst beim Erwärmen gut reduziert; fuchsinschweflige Säure gab auch nach 2-tägigem Stehen keine Farbreaktion.

4,032 mg Subst.: 4,850 mg CO_2, 2,290 mg H_2O. — 3,704 mg Subst.: 0,178 ccm N_2 (25°, 761 mm). — 4,089 mg Subst.: 3,790 mg AgJ.

$C_7H_{16}ONJ$ (257,1)	Ber.	C 32,68	H 6,22	N 5,45	J 49,42
	Gef.	„ 32,81	„ 6,35	„ 5,51	„ 50,10.

Crotonaldehyd-dimethylacetal.

Zur Darstellung des Dimethylacetals folgten wir der Vorschrift von A. Wohl[1]) und F. Frank für das Diäthylacetal. Das als Zwischenprodukt auftretende Chlorbutyraldehyd-dimethylacetal hatte einen Siedepunkt von 61—63° bei 24 mm. Die Abspaltung von HCl mit gepulvertem KOH lieferte ein Reaktionsprodukt, das wegen des großen Siedetrajekts wiederholt fraktioniert werden mußte. Aus 100 g Crotonaldehyd erhielten wir 20 g Dimethylacetal vom Siedep. 116—119° (Hauptanteil 118°).

[1]) B. 35, 1906 (1902).

α-Chlor-β-oxy-n-butyraldehyd-dimethylacetal.

20 g Crotonaldehyd-dimethylacetal wurden in 20 ccm Wasser suspendiert und unter Eiskühlung unterchlorige Säure (s. oben) in geringem Überschuß zugefügt. Letzterer wurde nach der rasch verlaufenden Addition mit Bisulfitlösung weggenommen. Das Reaktionsgemisch haben wir dann nach Sättigung mit K_2CO_3 (Gelbfärbung) ausgeäthert, die farblose Ätherlösung über Na_2SO_4 getrocknet und den Rückstand 2-mal destilliert. Ausbeute 15 g farbloses Öl vom Siedep. 78° bei 0,6 mm.

5,133 mg Subst.: 7,920 mg CO_2, 3,450 mg H_2O. — 17,726 mg Subst.: 15,530 mg AgCl.

$C_6H_{13}O_3Cl$ (168,6)	Ber.	C 42,73	H 7,72	Cl 21,07
	Gef.	„ 42,08	„ 7,47	„ 21,67.

Die Differenzen der Analysenwerte dürften auf eine Verunreinigung durch das Dichlorderivat zurückzuführen sein.

α-Oxy-β-dimethylamino-n-butyraldehyd-dimethyl-acetal.

α-Chlor-β-oxy-n-butyraldehyd-dimethyl-acetal wurde in Portionen von 5 g mit 5 g NaJ und 40 ccm 33-proc. methylalkoholischer Dimethylaminlösung in Einschlußröhren 2 Tage auf 100° erhitzt. Nach Absaugen des Bodenkörpers wurde die braungefärbte Lösung i. V. eingedampft, das zurückbleibende Öl mit 6 n-HCl unter Kühlung genau neutralisiert und zur Entfernung nichtbasischer Begleitstoffe ausgeäthert. Hierauf machten wir mit konz. Lauge alkalisch und sättigten mit K_2CO_3, wobei 2 Schichten entstanden. Die obere Schicht wurde mit Äther aufgenommen und diese Lösung über Na_2SO_4 getrocknet. Bei der Destillation (0,5 mm) ging ein farbloses Öl vom konstanten Siedep. 80° über. Ausbeute 3 g pro Ansatz. Die Verbindung erstarrte beim Abkühlen, Schmelzpunkt ungefähr 30°.

5,398 mg Subst.: 10,585 mg CO_2, 5,180 mg H_2O. — 3,652 mg Subst.: 0,263 ccm N_2 (22°, 762 mm).

$C_8H_{19}O_3N$ (177,2)	Ber.	C 54,24	H 10,73	N 7,91
	Gef.	„ 53,48	„ 10,67	„ 8,36.

Um zu prüfen, ob es sich in der Tat um ein α-Oxyderivat handelt, wurde eine Probe des Acetals mit konz. Salzsäure verseift, der freie

Aldehyd mit Bromwasser zur Säure oxydiert und diese in Eisessiglösung mit Blei-tetra-acetat behandelt. Wie erwartet, reduzierte das Reaktionsprodukt Fehlingsche Lösung.

Quaternäres (Trimethyl)-ammonium-chlorid von α-Oxy-β-amino-n-butyraldehyd-dimethylacetal.

1 g α-Oxy-β-dimethylamino-n-butyraldehyd-dimethylacetal wurde in 2 ccm Methanol gelöst und dann 4 ccm Methyljodid zugefügt. Die wie in den analogen Fällen vorgenommene Aufarbeitung führte bei der Fällung mit Äther nur zu einem öligen Produkt. Dieses wurde zur Umwandlung in das Chlorid in 25 ccm Methanol gelöst und 2 Stunden mit Silberchlorid (aus 2 g $AgNO_3$) geschüttelt. Nach Filtrieren und Abdampfen blieb ein fast farbloser Sirup zurück. Das Chlorid lieferte ein zunächst öliges Chloroaurat, das jedoch rasch krystallin wurde. Der Schmelzpunkt von 90° war nach dem Umkrystallisieren nicht verändert.

3,210, 2,816 mg Subst.: 1,193, 1,046 mg Au.

$C_9H_{22}O_3NCl_4Au$ (531,2) Ber. Au 37,10
Gef. „ 37,17, 37,15.

Quaternäres (Trimethyl)-ammoniumchlorid von α-Oxy-β-amino-n-butyraldehyd.

500 mg des quaternären Ammoniumchlorids des Acetals wurden in 5 ccm gekühlter konz. Salzsäure gelöst. Nach 3 Stunden haben wir die gelbbraune Lösung mit Wasser verdünnt, mit Tierkohle behandelt und i. V. über konz. H_2SO_4 eingedampft. Der zurückbleibende hellgelbe Sirup reduzierte Fehlingsche Lösung und gab mit fuchsinschwefliger Säure ziemlich rasch eine, wenn auch nicht intensive, Violettfärbung. Das aus dem Chlorid erhaltene Chloroaurat war sehr feinkörnig und ließ sich nicht gut umkrystallisieren. Schmelzpunkt 195—196°.

4,716 mg Subst.: 3,020 mg CO_2, 1,440 mg H_2O. — 1,904 mg Au. — 2,913 mg Subst.: 0,077 mg N_2 (22°, 757 mm).

$C_7H_{16}O_2NCl_4Au$ (485,2) Ber. C 17,32 H 3,30 N 2,89 Au 40,62
Gef. „ 17,46 „ 3,39 „ 3,05 „ 40,37.

α,β-Pentenal-dimethylacetal und -diäthylacetal.

Das Dimethylacetal wurde ebenso wie das Diäthylacetal[1]) aus dem entsprechenden α-Bromderivat durch HBr-Abspaltung gewonnen. Die Siedepunkte waren:

α-Brom-n-valeraldehyd-dimethylacetal	94° bei 30 mm
α-Brom-n-valeraldehyd-diäthylacetal	97° bei 23 mm
α,β-Pentenal-dimethylacetal.	68° bei 45 mm
α,β-Pentenal-diäthylacetal	62° bei 16 mm

α-Chlor-β-oxy-n-valeraldehyd-dimethylacetal und -diäthylacetal.

Die Ausführung der Reaktion entsprach jener beim Acetal des Crotonaldehyds, doch haben wir wegen der hier langsamer verlaufenden Addition (2 Stunden) möglichst im Dunkeln gearbeitet, wobei das Reaktionsgemisch geschüttelt und gut gekühlt wurde. Das entsprechende Dimethylacetal zeigte einen Siedepunkt von 71° bei 0,3 mm.

4,928 mg Subst.: 8,195 mg CO_2, 3,430 mg H_2O. — 13,750 mg Subst.: 11,200 mg AgCl.

$C_7H_{15}O_3Cl$ (182,6)	Ber.	C 46,03	H 8,22	Cl 19,45
	Gef.	„ 45,35	„ 7,74	„ 20,15.

Die Differenzen der Analysenwerte dürften auch hier auf eine Verunreinigung durch das Dichlorderivat zurückzuführen sein. Für das in schlechterer Ausbeute erhaltene Diäthylacetal wurde ein Siedepunkt von 88° (bei 0,3 mm) gefunden.

α-Oxy-β-dimethylamino-n-valeraldehyd-dimethylacetal und -diäthylacetal.

2,2 g α-Chlor-β-oxy-n-valeraldehyd-dimethylacetal, 2,2 g NaJ und 20 ccm 33-proc. methylalkoholische Dimethylaminlösung wurden in Einschlußröhren 2 Tage auf 100° erhitzt. Die übliche Aufarbeitung führte zu einem Dimethylacetal vom Siedep. 77° bei 0,3 mm.

5,102 mg Subst.: 10,520 mg CO_2, 4,910 mg H_2O. — 2,992 mg Subst.: 0,201 ccm N_2 (22,5°, 752 mm).

$C_9H_{21}O_2N$ (191,2)	Ber.	C 56,54	H 10,99	N 7,33
	Gef.	„ 56,23	„ 10,69	„ 7,67.

[1]) B. 35, 1906 (1902).

Das ebenfalls dargestellte Diäthylacetal zeigte bei 0,3 mm den Siedep. 86°. Zum Nachweis der α-Oxygruppe haben wir wieder den bei der C_4-Reihe beschriebenen Abbau der entsprechenden Carbonsäure mit Bleitetraacetat durchgeführt.

Quaternäre (Trimethyl)-ammonium-halogenide von α-Oxy-β-amino-n-valeraldehyd-dimethylacetal und -diäthylacetal.

0,5 g Dimethylacetal in 1,5 ccm Methanol wurden mit 2 ccm Methyljodid versetzt und 30 Minuten auf dem Wasserbad erwärmt. Bei der Fällung mit Äther schied sich das quaternäre Ammoniumjodid des Dimethylacetals als Öl ab; auch das durch Schütteln der alkoholischen Lösung mit überschüssigem Silberchlorid erhaltene quaternäre Chlorid war nicht zur Krystallisation zu bringen, dagegen konnte ein krystallines Chloroaurat erhalten werden. Schmelzpunkt (unscharf) ungefähr 90°.

2,700 mg Subst.: 0,970 mg Au.

$C_{10}H_{24}O_3NCl_4Au$ (545,2) Ber. Au 36,15 Gef. Au 35,95.

Das auf analoge Weise dargestellte quaternäre (Trimethyl)-ammoniumjodid des Diäthylacetals wurde krystallisiert erhalten. Schmelzpunkt 125°. Das über das Chlorid erhaltene Chloroaurat schmolz ebenfalls bei ungefähr 90° (unscharf).

3,177 mg Subst.: 1,105 mg Au.

$C_{12}H_{28}O_3NCl_4Au$ (569,3) Ber. Au 34,48 Gef. Au 34,78.

Quaternäres (Trimethyl)-ammoniumchlorid von α-Oxy-β-amino-n-valeraldehyd.

500 mg des quaternären Chlorids vom Dimethyl- bzw. Diäthylacetal wurden mit 3 ccm konz. Salzsäure versetzt; nach 3 Stunden haben wir mit Wasser verdünnt, mit Tierkohle entfärbt und das Filtrat i. V. über konz. H_2SO_4 und Ätznatron eingedampft. Der hellgelbe sirupöse Rückstand reduzierte Fehlingsche Lösung und gab mit fuchsinschwefliger Säure ziemlich rasch eine violettrote Färbung; diese war nur in konz. Lösung intensiv. Das aus dem Chlorid erhaltene Reineckat war mikrokrystallin, konnte aber durch Umkrystallisieren aus Aceton-Wasser in unvollständig ausgebildeten Rauten erhalten werden.

Chloroaurat. Ein Teil des quaternären Chlorids wurde in das Chloroaurat umgesetzt. Der Schmelzpunkt wurde nach dem Umkrystallisieren etwa bei 175° gefunden, schwankte jedoch bei Präparaten verschiedener Herstellung. Beim Aufbewahren wurden diese Chloroaurate ziemlich bald mißfarben; frisch dargestellt lieferten sie jedoch stimmende Werte für den Goldgehalt.

4,576 mg Subst.: 3,315 mg CO_2, 1,520 mg H_2O, 1,791 mg Au. — 3,303 mg Subst.: 0,074 ccm N_2 (22°, 757 mm). — 3,055, 1,825, 1,740 mg Subst.: 1,203, 0,730, 0,700 mg Au.

$C_8H_{18}O_2NCl_4Au$ (499,2)

Ber.	C 19,24	H 3,61	N 2,81	Au 39,50
Gef.	„ 19,75	„ 3,69	„ 2,58	„ 39,14, 39,38, 40,00, 40,23.

In orientierenden Versuchen wurde das quaternäre (Trimethyl)-ammoniumchlorid des α-Oxy-β-amino-n-valeraldehyds sowie das in Abschnitt I beschriebene Isomere dem Hofmannschen Abbau unterworfen. Während Trimethylamin unschwer in Form des Chloroaurats zu identifizieren war, konnte die daneben zu erwartende α,β-Dioxy-valeriansäure nicht krystallin erhalten werden. Die betreffenden Versuche müssen jedoch mit etwas größeren Substanzmengen wiederholt werden.

(*2,3*)(*6,7*)-*Di-epoxy-octan-di-ol*(*4,5*) (XVI).

(Unter Mitarbeit von P. J. van der Laan[1]).

15 g Dipropenyl-glycol (Siedep. 122—125° bei 11 mm) wurden in 50 ccm Petroläther (40—60°) gelöst und unter Kühlung eine konz. Lösung von Benzopersäure in Äther zugefügt, wobei ein geringer Überschuß zur Anwendung kam. Nach mehrtägigem Aufbewahren im Kühlschrank hatte sich an der Kolbenwand ein Krystallisat abgeschieden; dieses wurde mit Äther ausgewaschen und aus Aceton-Alkohol umkrystallisiert. Die Ausbeute ist sehr bescheiden; wir erhielten nur etwa 2 g Dioxydo-glycol vom Schmelzp. 138—140°. Bei den ersten Versuchen, in denen die Oxydation in Chloroformlösung vorgenommen wurde, war die Ausbeute noch geringer.

[1]) Die folgenden, in Gemeinschaft mit Herrn P. J. van der Laan ausgeführten Versuche sind durch v. d. L. gekennzeichnet.

5,323 mg Subst.: 10,805 mg CO_2, 3,900 mg H_2O, 0,015 mg Rückstand.

$C_8H_{14}O_4$ (174,1) Ber. C 55,18 H 8,05 Gef. C 55,51 H 8,16.

Aus vereinigten Mutterlaugen isolierten wir einen Stoff, der nach Umkrystallisieren aus Aceton und etwas Alkohol bei 178° schmolz. Aus der Analyse ergibt sich, daß einer der beiden Epoxy-Ringe hydrolytisch aufgespalten ist, also ein 2,3-Epoxy-octan-4,5,6,7-tetra-ol vorliegt.

3,175 mg Subst.: 5,850 mg CO_2, 2,360 mg H_2O.

$C_8H_{16}O_6$ (192,1) Ber. C 50,00 H 8,33 Gef. C 50,25 H 8,32.

2,3-Epoxy-butanal (v. d. L.).

7 g (2,3)(6,7)-Di-epoxy-octan-4,5-di-ol und 17 g Bleitetraacetat wurden mit 475 g Pentan versetzt und unter Feuchtigkeitsausschluß am Wasserbad leicht erwärmt. Nach einigen Tagen gab eine Probe des Reaktionsgemischs auf feuchtem Filtrierpapier keine Braunfärbung mehr. Die Pentanlösung wurde dann abfiltriert, zur Entfernung der Essigsäure (nach Zusatz von etwas Wasser) mit festem $NaHCO_3$ geschüttelt, mit $CaCl_2$ getrocknet und hierauf mit Hilfe eines Fraktionieraufsatzes langsam destilliert. Die zurückbleibende Flüssigkeit (etwa 1,5 ccm) haben wir unter schwach vermindertem Druck mehrmals destilliert, wobei wir schließlich 400 mg einer farblosen, stark reduzierenden Fraktion vom Siedep. 87—88° (bei 400 mm) erhielten. Bei Zugabe eines Tropfens zu einer Lösung von Kaliumjodid in Eisessig wurde Jod in Freiheit gesetzt. Wie die Analyse zeigte, war die Abtrennung des Oxydo-aldehyds vom Lösungsmittel nicht völlig gelungen.

4,986 mg Subst.: 10,250 mg CO_2, 3,440 mg H_2O.

$C_4H_6O_2$ (86) Ber. C 55,81 H 6,98 Gef. C 56,07 H 7,67.

Umsetzung zu den quaternären (Trimethyl)-ammoniumsalzen von α-Oxy-amino-n-butyr-aldehyd (v. d. L.).

200 mg 2,3-Epoxy-butanal wurden unter Kühlen mit 4 ccm einer 15-proc. wäßrigen Dimethylaminlösung versetzt. Nach einigen Tagen wurde das Reaktionsgemisch in der

üblichen Weise aufgearbeitet. Die als Rückstand des Ätherextrakts erhaltene ölige Aldehydbase wurde in 1 ccm Methanol aufgenommen, 2 ccm Methyljodid zugegeben und kurz erwärmt. Das mit Äther ausgefällte quaternäre Jodid, ebenfalls ein Öl, lieferte 320 mg Reineckat. Dieses wurde aus Aceton-Wasser umkrystallisiert, wobei wir durch allmähliche Entfernung des Acetons i. V. zu verschiedenen Fraktionen kamen. Der zuletzt auskrystallisierende Anteil gab die besten Analysenwerte.

2,029, 2,572 mg Subst.: 2,060, 2,665 mg CO_2, 0,920, 1,140 mg H_2O. — 1,395 mg Subst.: 0,256 ccm N_2 (26°, 755 mm).

$C_{11}H_{22}O_2N_7S_4Cr$ (464,5)	Ber.	C 28,45	H 4,74	N 21,12
	Gef.	„ 27,69	„ 5,04	„ 20,83
		„ 28,26	„ 4,92	

Das aus dem Reineckat auf die gewöhnliche Weise erhaltene Chloroaurat behielt trotz mehrfachen Umkrystallisierens einen unscharfen Schmelzpunkt; der Goldgehalt war etwa 2 Proc. zu hoch. Wahrscheinlich dürfte auch das Reineckat nicht einheitlich gewesen sein. In Anbetracht der schlechten Ausbeute an Epoxy-aldehyd haben wir auf die weitere Bearbeitung dieses Weges verzichtet, zumal das quaternäre Chlorid bei der pharmakologischen Prüfung nicht wirksamer war als das über das Acetal erhaltene Präparat.

Versuche zu Abschnitt III.

Isolierung von Muscarin.

Um einen Rückgang des Muscaringehalts durch Oxydationsprozesse möglichst einzuschränken, wurde dafür gesorgt, daß die frischen Fliegenpilze (100 kg) rasch zerteilt und schon 3 Stunden nach der Ernte unter Alkohol kamen; nachdem durch die Gefäße 2 Stunden Stickstoff geleitet wurde, haben wir diese gut verschlossen und kühl aufbewahrt. Aus äußeren Gründen konnte die Aufarbeitung jedoch erst nach 3 Wochen begonnen werden. Nach Abdampfen des Alkohols bei 50° erhielten wir 2 kg Rohsirup von 77 Proc. Trockengehalt und einer Aktivität von 25000 MWE pro Gramm; dies entsprach

278 mg Muscarin. Der Gehalt war demnach trotz der rascheren Konservierung nach der Ernte nicht höher als früher.

Bei der weiteren Verarbeitung folgten wir völlig der früher gegebenen Arbeitsvorschrift. Diese erwies sich als sehr gut reproduzierbar, insbesondere wurden bei den einzelnen Reinigungsstufen fast die gleichen Anreicherungen erhalten. Die rohen Reineckat-Fällungen wurden mehrmals aus Aceton-Wasser (1 : 1) umkrystallisiert. Neben weniger aktivem Material (Chromgehalt 11—11,5 Proc.) isolierten wir 130 mg eines Reineckats, dessen Aktivität nach Umwandlung in das Chlorid 160—170 · 10^6 MWE betrug.

4,109, 4,285, 4,042 mg Subst.: 4,730, 4,880, 4,610 mg CO_2, 2,020, 2,080, 1,970 mg H_2O, 0,730, 0,630 mg Rückstand (Cr_2O_3). — 2,707 mg Subst.: 0,459 ccm N_2 (25°, 755 mm).

$C_{13}H_{24}O_2N_7S_4Cr$ (478,5)

Ber.	C 30,13	H 5,02	N 20,50	Cr 10,88
Gef.	„ 31,30	„ 5,46	„ 19,30	„ —
	„ 31,06	„ 5,39	—	„ 11,66
	„ 31,10	„ 5,41	—	„ 10,66.

Aus den Analysen und der etwas geringeren pharmakologischen Wirksamkeit war zu schließen, daß das neu dargestellte Präparat noch nicht völlig rein war.

Molekulargewichtsbestimmung von Muscarin-chlorid.

Wir haben die kryoskopische Bestimmung in Eisessig zunächst bei Testsubstanzen im Mikroversuch geprüft. Hierzu wurden 0,5—2 mg Substanz in 12—20 mg Eisessig gelöst, wobei 4 cm lange Röhrchen (Durchmesser oben 3 mm, unten 1,5 mm) zur Anwendung kamen. Die Röhrchen wurden zugeschmolzen und die Lösung in einer Kältemischung zum Erstarren gebracht. Die Bestimmung des Schmelzpunktes erfolgte in einem vorher auf etwa 0° abgekühlten Ölbad, wobei wir gleichzeitig in einem 2. Röhrchen den Schmelzpunkt des verwendeten Eisessigs feststellten. Die Temperatur wurde mit Hilfe einer Lupe an einem in halbe Grade eingeteilten Anschütz-Thermometer (−10 bis +50°) abgelesen.

Trimethylamin-hydrochlorid.

2,094, 1,136 mg Subst. in 13,304, 12,346 mg Eisessig; Δ = 6,5 u. 3,0°.

M. G. Ber. 95,5 Gef. 94, 119.

α-Oxy-β-dimethylamino-n-valeriansäure.

0,353, 1,932 mg Subst. in 7,047, 15,083 mg Eisessig; $\Delta = 1{,}4$ u. $4{,}3^0$.

M. G. Ber. 161 Gef. 125, 116.

Acridin.

1,626 mg Subst. in 11,109 mg Eisessig; $\Delta = 3{,}2^0$.

M. G. Ber. 180 Gef. 178.

Nach dem Ergebnis dieser Kontrollbestimmungen haben wir Muscarin-Reineckat in das Chlorid umgesetzt, dieses zur Entfernung von Spuren anorganischer Salze in absolutem Alkohol aufgenommen und filtriert. Die Lösung wurde dann aus einem kleinen Tropftrichter mit capillarer Auslaufröhre in ein vorher gewogenes Schliffkölbchen (Volumen 1—2 ccm) gesogen, bei 50° zur Trockne gedampft und der Rückstand in Eisessig gelöst.

3,150 mg Muscarin-Reineckat gaben 1,300 mg Muscarin-chlorid (theor. 1,285 mg); in 43,2 mg Eisessig gelöst: $\Delta = 0{,}85^0$.

3,105 mg Muscarin-Reineckat gaben 1,400 mg Muscarin-chlorid (theor. 1,270 mg); in 38,5 mg Eisessig gelöst: $\Delta = 0{,}65^0$.

$C_8H_{16}O_2NCl$ M. G. Ber. 195,5 Gef. 136, 190.

Muscarin-chloroaurat.

8 mg Reineckat wurden in der üblichen Weise in das Chlorid umgesetzt, dieses in 0,5 ccm Wasser gelöst und 4 Tropfen 30-proc. Goldchloridlosung zugefügt. Nach vorübergehender Trübung krystallisierte das Chloroaurat rasch aus; es bildete glänzende Blättchen vom Schmelzpunkt 115—117°.

0,791 mg Subst.: 0,316 mg Au.

$C_8H_{18}O_2NCl_4Au$ (499,2) Ber. Au 39,48 Gef. Au 39,95.

[Mitteilungen aus dem Institut für organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt.]

(Eingelaufen am 4. Juni 1942.)

Über Samandaron und Samandaridin, Nebenalkaloide im Gift des Feuer- und Alpensalamanders*);

von *Clemens Schöpf* und *Kurt Koch*[1]).

In der ersten Mitteilung[2]) ist die Aufarbeitung des Rohgifts aus den Hautdrüsen des Feuer- und Alpensalamanders (S. maculosa und atra) auf die ätherlöslichen Alkaloide und die Gewinnung des Hauptalkaloids, des *Samandarins* beschrieben worden. Die ätherlöslichen Basen bestehen beim Feuersalamander zu rund 60—65 Proc. und beim Alpensalamander zu rund 65—70 Proc. aus Samandarin.

In der vorliegenden Arbeit wurden nun die *Nebenalkaloide* des Samandarins einer näheren Untersuchung unterworfen. Zu ihrer Isolierung wurde zuerst das Samandarin unter Benutzung der Tatsache abgetrennt, daß Samandarin-chlorhydrat und noch mehr das Bromhydrat in Wasser verhältnismäßig schwer löslich ist. Die Chlorhydrate bzw. Bromhydrate der Nebenbasen bleiben teils wegen ihrer größeren Löslichkeit, teils auch, weil sie nur in sehr geringer Menge vorliegen, in der Mutterlauge. Aus dieser praktisch samandarinfreien Mutterlauge werden sie durch Alkalischmachen und neuerliches Ausäthern als Basen gewonnen. Beim Verdunsten des Äthers bleibt ein teilweise krystallisierter Rückstand, aus dem der krystallisierte Anteil durch Anreiben mit absolutem Äther und Umkrystallisieren aus wäßrigem Aceton rein gewonnen

*) Herrn Geheimrat H. Wieland zum 65. Geburtstag gewidmet.

[1]) 2. Mitteilung über Salamanderalkaloide; vgl. Diss. K. Koch, Techn. Hochschule, Darmstadt 1938 (D 87).

[2]) C. Schöpf u. W. Braun, A. 514, 69 (1934).

werden kann. Dieses krystallisierte Nebenalkaloid erwies sich als identisch mit dem *Samandaron*, das schon vorher durch Oxydation des Samandarins mit Chromsäure erhalten worden war. Das Vorkommen eines Ketons neben dem entsprechenden Alkohol bei Naturstoffen bietet nichts Besonderes. Das gleichzeitige Vorkommen von Zibetol und Zibeton im Sekret der Zibetkatze[1]), von Lobelidin, Lobelin und Lobelanin in dem Alkaloidgemisch der Lobeliapflanze[2]) sind weitere Beispiele hierfür.

Die Abtrennung des Samandarons aus den Nebenbasen gelingt in der beschriebenen Weise keineswegs quantitativ, denn es bleibt noch viel Samandaron zusammen mit weiteren öligen Nebenbasen in der Mutterlauge gelöst. Um die Menge des vorhandenen Samandarons annähernd quantitativ zu bestimmen, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, das Basengemisch in Pyridin mit Benzoylchlorid zu benzoylieren. Aus den entstandenen, nicht mehr basischen N-Benzoylverbindungen kann durch Umkrystallisieren aus Alkohol N-Benzoylsamandaron rein gewonnen werden. Die dann noch öligen Anteile aus den Mutterlaugen werden mit Semicarbazid behandelt; aus dem Gemisch der entstandenen Semicarbazone wird der Rest des Samandarons in Form des in Alkohol besonders schwer löslichen N-Benzoyl-samandaron-semicarbazons erhalten. Auf diese Weise läßt sich das im Gemisch der Nebenalkaloide vorhandene Samandaron annähernd quantitativ fassen, während andere Methoden zur Abtrennung des Samandarons, wie z. B. die Darstellung der Pikrate, der Quecksilberchloriddoppelsalze und der Semicarbazone versagten.

Die Menge des Samandarons beträgt beim Feuersalamander etwa 10 Proc. der gesamten ätherlöslichen Alkaloide, und beim Alpensalamander etwa ebensoviel, so daß Samandarin und Samandaron zusammen weitaus den größten Teil, beim Feuersalamander mindestens etwa 70—75 Proc., beim Alpensalamander noch etwas mehr der ätherlöslichen Basen des Salamandergifts ausmachen.

---

[1]) L. Ruzicka, H. Schinz u. C. F. Seidel, Helv. **10**, 696 (1927).

[2]) H. Wieland u. O. Dragendorff, A. **478**, 83 (1929).

Ein weit interessanteres Nebenalkaloid fand sich, als das Gemisch der Chlorhydrate der Nebenbasen, die früher aus den Alkoholmutterlaugen von der Umkrystallisation des Samandarinchlorhydrats erhalten worden waren, mit wenig Wasser angerieben und der in Wasser schwer lösliche Anteil aus Wasser umkrystallisiert wurde. Es ergab sich so in geringer Menge ein in Wasser verhältnismäßig schwer lösliches Chlorhydrat vom Schmelzp. 343° (unkorr.). Die Zerlegung dieses Chlorhydrats mit verdünntem Ammoniak ergab die freie Base, die sich aus Alkohol umkrystallisieren läßt, und überraschend hoch, bei 290°, schmilzt. Wir bezeichnen dieses in nur geringer Menge isolierbare Nebenalkaloid als *Samandaridin*[1]). Das Chlorhydrat des Samandaridins war schon von W. Braun in den Mutterlaugen des Samandarin-chlorhydrats beobachtet worden. Beim Alpensalamander haben wir Samandaridin bisher nur in dem Gift aus männlichen Tieren gefunden, während weibliche Tiere anscheinend kein Samandaridin enthalten. Diese Frage bedarf jedoch noch sorgfältiger Nachprüfung, wie es auch nötig sein wird, beim Feuersalamander Männchen und Weibchen, die bisher gemeinsam auf Nebenalkaloide verarbeitet wurden, getrennt aufzuarbeiten, um festzustellen, ob vielleicht auch hier nur bei den Männchen Samandaridin auftritt.

Neben Samandaron und Samandaridin hat sich in den Nebenalkaloiden des Feuersalamanders in der im Versuchsteil beschriebenen Weise auch noch das Vorliegen von mindestens einer weiteren sekundären oder primären Base ohne Ketoncharakter und durch die Darstellung eines neuen, nicht krystallisierten N-Benzoyl-semicarbazons das Vorliegen einer weiteren sekundären oder primären Base mit Ketoncharakter nachweisen lassen. Schließlich muß auch noch eine oder mehrere tertiäre Basen vorhanden sein, da ein kleiner Teil des Nebenbasengemisches bei der Benzoylierung seinen basischen Charakter beibehält, demnach also keinen Wasserstoff am Stickstoff tragen kann. Rein und krystallisiert

[1]) Der Name Samandaridin wurde erstmalig von E. S. Faust [A. Pth. 43, 84 (1900)] für eine von ihm aus Feuersalamandern als Sulfat isolierte Base der angeblichen Zusammensetzung $C_{20}H_{31}ON$ verwandt. Für das Vorliegen einer solchen neuen Base neben Samandarin haben sich bis jetzt in unseren Versuchen noch keinerlei Anhaltspunkte ergeben, so daß der Name Samandaridin für das jetzt isolierte zweite Nebenalkaloid vom Schmelzp. 290° frei geworden ist.

hat sich bisher noch keine dieser nur in geringer Menge vorhandenen Nebenbasen darstellen lassen.

Die nähere Untersuchung des *Samandaridins* hat ergeben, daß es eine starke, optisch aktive Base ist, die in krystallisiertem Zustand in Äther sehr schwer, in Chloroform dagegen ziemlich leicht löslich ist. Die Analyse, die Molekulargewichtsbestimmung und die Analyse von mehreren, in praktisch quantitativer Ausbeute erhältlichen Derivaten ergab für das Samandaridin die Summenformel $C_{21}H_{31}O_3N$. Es enthält also zwei Kohlenstoffatome und ein Sauerstoffatom mehr als Samandarin. Der Stickstoff liegt im Samandaridin sekundär gebunden vor, denn es nimmt beim Behandeln mit Methyljodid am Stickstoff 2 Methylgruppen unter Bildung des quartären *N-Methyl-samandaridin-jodmethylats* auf. Mit salpetriger Säure wird eine schön krystallisierte *N-Nitrosoverbindung*, bei der Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin eine *Monoacetylverbindung* erhalten, die nicht mehr basisch ist und demnach den Acetylrest am Stickstoff tragen muß.

Von den drei Sauerstoffatomen liegt offenbar keines als Hydroxylgruppe vor, denn Samandaridin nimmt bei der Acetylierung nur eine Acetylgruppe am Stickstoff auf, das N-Nitroso-samandaridin bleibt beim Versuch, es zu acetylieren, unverändert, und bei der Bestimmung des aktiven Wasserstoffs nach Zerewitinoff unter den Bedingungen, unter denen Samandarin glatt 2 Mol. Methan aus dem sekundären Stickstoff und dem alkoholischen Hydroxyl liefert, gibt Samandaridin genau 1 Mol. Methan entsprechend dem durch Acetylierung und Nitrosierung nachgewiesenen Wasserstoff am Stickstoff. Bei höherem Erhitzen auf 95° wird allerdings noch mehr, bis zu 0,6 Mol. Methan entwickelt, jedoch stammt dieses offenbar aus einer unter Bildung eines Hydroxyls oder unter Wasserabspaltung verlaufenden Nebenreaktion[1]), wofür auch spricht, daß beim Aufarbeiten des erhitzten Reaktionsansatzes ein Gemisch von verschiedenen, noch nicht rein dargestellten Reaktionsprodukten erhalten wird.

Eine Ketogruppe ist mit Ketonreagenzien nicht nachzuweisen. Samandaridin reagiert mit Semicarbazid in essig-

[1]) Vgl. dazu W. Borsche u. J. Niemann, A. 499, 65 (1932).

saurer Lösung auch bei 6-stündigem Erhitzen auf 100° nicht, und ebenso wird mit Hydroxylamin in alkoholisch-alkalischer Lösung auch nach 3-stündigem Erhitzen auf 100° kein Oxim erhalten. Das schließt für das Samandaridin das Vorliegen einer normal reagierenden Carbonylgruppe aus.

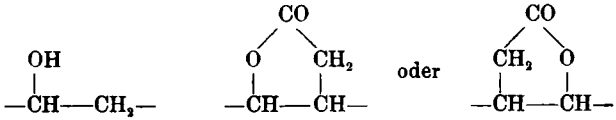
Behandelt man Samandaridin einige Zeit mit alkoholischem Kali, so wird es unter Aufnahme von 1 Mol. Wasser in eine in verdünnter Essigsäure schwer lösliche Verbindung übergeführt, die in Alkali spielend löslich ist und deren saure Natur auch durch die Darstellung eines schön krystallisierten Silbersalzes der Formel $C_{21}H_{32}O_4NAg$ nachgewiesen werden konnte. Aus dieser *Samandaridinsäure* werden beim Erwärmen mit Mineralsäuren die entsprechenden Salze des Samandaridins zurückerhalten. Dadurch ist Samandaridin als *Lacton* charakterisiert, und damit sind zwei von den drei Sauerstoffatomen des Samandaridins in ihrer Funktion aufgeklärt. Samandaridinsäure läßt sich im übrigen im Hochvakuum auf 80° erhitzen, ohne daß Wasserabspaltung zum Lacton eintritt, was darauf hinweist, daß in der Samandaridinsäure die saure Carboxylgruppe mit der basischen Iminogruppe ein Salz bildet. Samandaridinsäure ist so ähnlich beständig, wie z. B. das Natriumsalz einer Oxysäure, die im freien Zustand in das Lacton übergeht.

Das dritte Sauerstoffatom des Samandaridins hat sich bisher in keiner Weise nachweisen lassen. Da das Vorliegen eines Hydroxyls nach dem oben Ausgeführten ausgeschlossen erscheint, könnte nur eine in ihrer Reaktionsfähigkeit gehinderte Carbonylgruppe oder ein Äthersauerstoffatom vorliegen. Letzteres erscheint am wahrscheinlichsten, auch aus der Analogie mit dem Samandarin heraus, in dem neben dem sekundären Stickstoff ein Äthersauerstoffatom mit Sicherheit nachgewiesen worden ist.

Unabhängig von der Entscheidung dieser Frage läßt sich aber nun eine Aussage über die Zahl der im Samandaridin vorliegenden Kohlenstoffringe machen. Denkt man sich in der Formel des Samandaridins die Iminogruppe durch zwei, die beiden Sauerstoffatome der Lactongruppe durch vier und das dritte Äther- oder vielleicht auch Carbonylsauerstoffatom

durch zwei Wasserstoffatome ersetzt, so erhält man für den dem Samandaridin zugrunde liegenden Kohlenwasserstoff die Summenformel $C_{21}H_{38}$. Gegenüber einem gesättigten aliphatischen Kohlenwasserstoff der Summenformel $C_{21}H_{44}$ enthält dieser Kohlenwasserstoff 6 Wasserstoffatome weniger. Da Samandaridin Permanganat in schwefelsaurer Lösung auch in der Hitze nicht entfärbt, in Eisessig kein Brom und bei der katalytischen Hydrierung keinen Wasserstoff aufnimmt, Doppelbindungen in ihm demnach nicht vorhanden sein können, muß es ebenso wie Samandarin *drei carbocyclische Ringe* enthalten.

Es liegt nahe, nach diesen Feststellungen als Arbeitshypothese einen konstitutionellen Zusammenhang zwischen Samandarin und Samandaridin anzunehmen, in der Art, daß sich Samandaridin vom Samandarin dadurch unterscheidet, daß in ihm an Stelle der Atomgruppierung I des Samandarins die Atomgruppierung II oder III vorliegt. Wir haben in der Absicht, Samandaridin von der Lactongruppe her um zwei



Kohlenstoffatome abzubauen, einige im Versuchsteil kurz erwähnte Vorversuche ausgeführt, die jedoch noch zu keinem Ziel geführt haben. Umgekehrt haben wir versucht, in das Samandaron zwei Kohlenstoffatome neben der Carbonylgruppe einzuführen, um so das Kohlenstoffgerüst der Teilformel II zu erhalten, und haben zu diesem Zweck Samandaron mit Oxalester umgesetzt. Arbeitet man ohne Kondensationsmittel, so entsteht, indem die NH-Gruppe des Samandarons mit einer Estergruppe des Oxalsäure-diäthylesters reagiert, lediglich das Säureamid aus Oxalsäure-monoäthylester und Samandaron. Arbeitet man dagegen bei Gegenwart von Natriumalkoholat, so tritt offenbar auch Kohlenstoff-Kohlenstoffkondensation ein. Es entsteht eine in Alkali lösliche Verbindung, in der der Oxalsäurerest vermutlich an einer der Carbonylgruppe benachbarten CH_2-Gruppe eingetreten ist. Da wir diese Ver-

bindung jedoch nicht krystallisiert erhalten konnten, so kann die im Samandaron durch die Kondensation mit Oxalester neben der Ketogruppe wahrscheinlich gewordene Methylengruppe noch nicht als sicher nachgewiesen gelten.

Einige neu dargestellte Derivate des Samandarons sind im Versuchsteil beschrieben. Samandaron gibt ebensowenig wie Samandaridin beim Stehen der Lösung in konzentrierter Salzsäure an der Luft die für Samandarin charakteristische Blauviolettfärbung.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* ergebenst für die Unterstützung der vorstehenden Arbeit.

Beschreibung der Versuche.

1. Die Isolierung von Samandaridin und Samandaron.

Aufarbeitung der bei der Darstellung von Samandarin-chlorhydrat aus S. maculosa erhaltenen Chlorhydratrückstände[1]).

96 g noch alkoholfeuchte, teilweise durchkrystallisierte, etwa 70 g wasserfreie Substanz enthaltende Chlorhydrate wurden mit 550 ccm Wasser von 40° durchgerieben; hierbei blieben 7,2 g eines krystallisierten Chlorhydrats (Fraktion A) ungelöst, das ab 312° sinterte und bei 320—325° unter Zersetzung schmolz. Durch Umkrystallisieren aus 100 ccm Wasser wurden hieraus 5,5 g Samandaridin-chlorhydrat vom Schmelzpunkt 337—339° (Zers.) erhalten; durch nochmaliges Umkrystallisieren aus 70 ccm Wasser erhielt man schließlich 4,2 g reines *Samandaridin-chlorhydrat* vom konstanten Schmelzpunkt 342—343° (Zers.). Die aus dem Chlorhydrat in Freiheit gesetzte Base schmolz bei 289—290°[2]).

Die bei der Umkrystallisation des Samandaridin-chlorhydrates hinterbleibenden Mutterlaugen ergaben beim Eindampfen auf $^1/_3$ ihres

[1]) C. Schöpf u. W. Braun, A. 514, 94 (1934).

[2]) Daß in den Mutterlaugen der Samandarindarstellung in geringer Menge ein in Wasser schwer lösliches Chlorhydrat vom Schmelzp. 343° vorliegt, war schon von W. Braun beobachtet worden (unveröffentlicht), der 0,14 g dieses Chlorhydrats aus 3000 Feuersalamandern isolieren konnte.

ursprünglichen Volumens nur geringe Mengen Samandaridin-chlorhydrat, so daß sie alkalisch ausgeäthert wurden. Hierbei erhielt man 1,7 g ölige Basen, die beim Anreiben mit Alkohol noch 0,2 g unreines Samandaridin vom unscharfen Schmelzp. 260—265° ergaben; durch einmaliges Umkrystallisieren aus Alkohol wurden hieraus schließlich 0,12 g reines *Samandaridin* vom Schmelzp. 288° gewonnen.

Die in Alkohol leicht löslichen rotgelben öligen Basen bildeten ein leicht lösliches Chlorhydrat, wurden in Form der etwas schwerer löslichen Brom- und Jodhydrate nur amorph erhalten und gaben mit Überchlorsäure keine krystallisierten Perchlorate. Ihre Untersuchung ist nicht weitergeführt worden.

Beim Versetzen der wäßrigen Mutterlauge der Fraktion A, die die Hauptmenge der Nebenalkaloide als Chlorhydrate enthielt, mit 60 g Kaliumbromid fielen bei 40° 17 g krystallisierte Bromhydrate aus (Fraktion B), die bei 250—260° unter Zersetzung schmolzen. Durch Umkrystallisieren aus 200 ccm Wasser wurden hieraus 8,0 g *Samandarin-bromhydrat* vom Schmelzp. 309° (Zers.) (Mischprobe mit reinem Samandarin-bromhydrat vom Schmelzp. 311° und Identifizierung als Base) erhalten. Durch Eindampfen der Mutterlauge i. V. auf die Hälfte ihres ursprünglichen Volumens krystallisierte kein weiteres Samandarin-bromhydrat aus, so daß die Mutterlauge sodaalkalisch ausgeäthert wurde. Nach dem Trocknen der Ätherlösung über Natriumsulfat und Verdampfen des Äthers hinterblieben 6,7 g krystallisierte Nebenbasen vom Schmelzpunkt 160—168° (Fraktion B_1).

Die nach der Abtrennung der Fraktion B hinterbleibende Mutterlauge wurde nunmehr mit weiteren 60 g Kaliumbromid bei 40° versetzt und lieferte nach zweitägigem Stehen bei Zimmertemperatur 30 g uneinheitliches, meist amorphes Bromhydratgemisch (Fraktion C), das in 100 ccm heißem Wasser aufgenommen wurde, wobei 2,6 g krystallisiertes Bromhydrat vom unscharfen Schmelzp. 270—290° (Zers.) ungelöst blieben und durch Absaugen und Nachwaschen mit 10 ccm Wasser von der Hauptmenge der leicht löslichen Bromhydrate abgetrennt wurden. Durch Umkrystallisieren dieser 2,4 g aus 25 ccm Wasser unter Zusatz von Tierkohle wurden 0,7 g *Samandarin-bromhydrat* vom Schmelzp. 291—296° (Zers.) (Mischprobe) erhalten. Die Mutterlauge, die die Hauptmenge der Brom-

hydrate der Fraktion C enthielt, lieferte durch sodaalkalisches Ausäthern insgesamt 19,5 g krystallisierte Nebenbasen vom unscharfen Schmelzp. 150—158° (Fraktion C_1).

Die so von Samandarin, Samandaridin und einem Teil des Samandarons befreite Lösung der Bromhydrate wurde nunmehr sodaalkalisch ausgeäthert und lieferte hierbei aus den ersten 6 Ätherauszügen 14,8 g krystallisierte Nebenbasen vom sehr unscharfen Schmelzp. 135—142° (Fraktion D), die zusammen mit den Fraktionen B_1 und C_1 auf Samandaron weiter verarbeitet wurden. Durch mehrtägige Ätherextraktion wurden noch weitere 1,1 g ölige Nebenbasen (Fraktion E) erhalten, die nicht näher untersucht wurden. Eine Extraktion mit Chloroform ergab schließlich noch 0,07 g ölige Base.

Zur *Reindarstellung des Samandarons* aus den Fraktionen B_1, C_1 und D wurden diese (41,0 g) mit 65 ccm absolutem Äther durchgerieben, nach einigem Stehen das Ungelöste abgesaugt und mit wenig eiskaltem absolutem Äther nachgewaschen, wodurch 24,4 g rohes Samandaron vom Schmelzpunkt 179—184° erhalten wurden; beim Verdampfen des Äthers hinterblieben die restlichen Nebenbasen als zähes Öl (16,0 g). Durch Extraktion des rohen Samandarons mit absolutem Äther aus der Hülse unter Stickstoff und Absaugen der im Kolben auskrystallisierten Base wurden schließlich 21,0 g praktisch reines Samandaron vom Schmelzp. 184—186° erhalten. In der Äthermutterlauge blieben auch hier ölige Nebenbasen (3,0 g) gelöst.

Dieses weitgehend gereinigte Samandaron ließ sich durch einmaliges Umkrystallisieren aus 35-proc. Aceton analysenrein vom konstanten Schmelzp. 188—190° erhalten. Mit Samandarin vom Schmelzp. 186° wurde eine Schmelzpunktsdepression von 30° erhalten, während die Mischprobe mit Samandaron, das durch Oxydation von Samandarin mit Chromsäure erhalten worden war, keine Depression ergab.

Um alle Zweifel über die Identität dieser Nebenbase mit Samandaron zu zerstreuen, wurden das *α-Oxim*, die *N-Benzoylverbindung* und das *N-Methyljodmethylat* nach den von C. Schöpf und W. Braun[1]) angegebenen Vorschriften dargestellt und mit den entsprechenden Derivaten

[1]) a. a. O., S. 104—105.

des aus Samandarin dargestellten Samandarons verglichen. Es ergab sich bei allen drei Derivaten in Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt völlige Identität von Samandaron, das aus den Hautdrüsen isoliert worden war, mit dem Samandaron, das durch Chromsäureoxydation aus Samandarin bereitet worden war.

Die öligen Basen, die aus dem zum Anreiben bzw. zur Extraktion des Samandarons verwandten Äther beim Eindampfen erhalten wurden, enthalten noch Samandaron, das in Form der schwer löslichen Benzoylverbindung isoliert werden kann.

Zu ihrer Darstellung wurden 1,5 g des öligen Nebenbasen-Gemisches aus dem zum Anreiben der vereinigten Fraktionen B_1, C_1 und D benutzten Äther in 45 ccm Pyridin gelöst und mit 1,7 g Benzoylchlorid versetzt. Nach 24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde die rotbraune klare Lösung in Eiswasser gegossen und unter Kühlung mit 2 n-Salzsäure angesäuert. Zur Entfernung der Benzoesäure wurde die Lösung samt dem darin befindlichen Niederschlag zweimal mit insgesamt 150 ccm Äther durchgeschüttelt, der Äther abgetrennt und 0,37 g amorphe aus der salzsauren Lösung abgeschiedene N-Benzoylverbindung durch Absaugen gewonnen. Beim Durchreiben mit Alkohol und Umkrystallisieren des Ungelösten aus Alkohol wurden 0,06 g *N-Benzoylsamandaron* vom Schmelzp. 245—247° (Mischprobe mit einem Kontrollpräparat vom Schmelzp. 249—250°) erhalten; die alkoholische Mutterlauge hinterließ nach dem Eindampfen ein nicht krystallisierendes Harz.

Zur Gewinnung der Hauptmenge der N-Benzoylverbindungen wurde der saure Ätherauszug nach dem Trocknen über Natriumsulfat eingedampft. Beim Durchreiben des teils krystallinen, teils amorphen Rückstands (2,1 g) mit 10 ccm absolutem Äther ging der größte Teil in Lösung, während 0,46 g Substanz vom Schmelzp. 240—244° (Sintern ab 235°) zurückblieben, aus denen durch Umkrystallisieren aus Alkohol 0,36 g *N-Benzoylsamandaron* vom Schmelzp. 248—250° (Mischprobe) erhalten wurden. Der zum Anreiben verwendete Äther wird zur Entfernung der Benzoesäure zweimal mit 1,5 n-Sodalösung durchgeschüttelt und gab nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen 0,85 g amorphe N-Benzoylverbindungen, die mit den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln nicht krystallisiert erhalten werden konnten. Als einzige wohldefinierte Verbindung wurden somit insgesamt 0,42 g N-Benzoylsamandaron = 21 Proc. der angewandten öligen Basen erhalten.

Die alkoholischen Mutterlaugen, die beim Anreiben der rohen Benzoylverbindungen und beim Umkrystallisieren des rohen N-Benzoylsamandarons erhalten worden waren, wurden vereinigt, zur Trockne verdampft, und der Rückstand nach der weiter unten für die Darstellung des N-Benzoyl-samandaron-semicarbazons gegebenen Vorschrift mit Semicarbazid behandelt. Es wurden so aus 0,52 g der amorphen N-Benzoyl-

verbindungen noch 0,02 g *N-Benzoyl-samandaron-semicarbazon* erhalten, die bei 245—250° unter Zersetzung schmolzen (Mischprobe mit einem Kontrollpräparat). Von etwa mit entstandenem Hydrazo-dicarbonamid kann das Semicarbazon durch Umkrystallisieren aus Alkohol getrennt werden.

Die Lösung, aus der sich das N-Benzoyl-samandaron-semicarbazon ausgeschieden hatte, wurde zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit 2 n-Essigsäure durchgerieben, wobei er pulverig fest und absaugbar wurde (0,5 g amorphe Substanz, die von 85° ab sinterte und bei 95—105° unter Aufschäumen schmolz). Dieses Produkt ließ sich durch Anreiben mit absolutem Äther in einen in Äther leicht und in einen darin schwer löslichen Anteil trennen. Der erstere wurde beim Eindampfen des zum Anreiben verwandten Äthers als amorpher Rückstand (0,3 g) erhalten, der auf keine Weise zur Krystallisation zu bringen war. Die Stickstoffbestimmung ergab Werte (4,1, 4,0 Proc. Stickstoff), die eindeutig zeigten, daß diese Verbindung nicht mit Semicarbazid reagiert hat, also offenbar keine Ketogruppen enthält. Es muß demnach in dem Alkaloidgemisch in geringer Menge ein weiteres *Nebenalkaloid mit sekundärem oder primärem Stickstoff* enthalten sein, das keinen Ketoncharakter hat.

Der in Äther schwer lösliche Anteil (0,2 g) wurde mit 15 ccm absolutem Äther aus der Hülse extrahiert. Die nach 8-, 16- und 48-stündiger Extraktionsdauer erhaltenen Produkte bestanden jeweils aus einem amorphen, in der angewandten Äthermenge löslichen Anteil (0,04, 0,02, 0,01 g), der jeweils nicht näher untersucht wurde, und einem in Äther schwerer löslichen Anteil, der sich bei der Extraktion in kugeligen Aggregaten ausschied, abgesaugt werden konnte (0,04, 0,03, 0,03 g) und mit fortlaufender Extraktion einen immer höheren Schmelzpunkt zeigte [158—163° (Sintern ab 115°), 184—188° (Sintern ab 160°), 205—210° (Sintern ab 200°)]. Die Stickstoffbestimmungen dieser drei Präparate, deren Umkrystallisation nicht gelang, ergaben Werte, die im Stickstoff etwas höher lagen, als sich für N-Benzoyl-samandaron-semicarbazon berechnet (gef. 14,8, 15,8, 12,4 Proc. Stickstoff), und die zeigten, daß noch mindestens eine weitere *Nebenbase mit sekundärem oder primärem Stickstoff von Ketoncharakter* neben dem Samandaron in dem Alkaloidgemisch vorkommen muß.

Daß schließlich in dem Gemisch der Nebenalkaloide auch noch eine *tertiäre Base* in geringer Menge vorhanden ist, von der es offenbleibt, ob sie Ketoncharakter hat oder nicht, folgt daraus, daß die salzsauer gemachte Mutterlauge von der Benzoylierung der Nebenbasen, die sauer erschöpfend ausgeäthert worden war, nach dem Alkalischmachen an Äther eine Base abgibt, die also nicht am Stickstoff benzoyliert worden sein kann und demnach tertiärer Natur sein muß. Die geringen Mengen dieser Nebenbase (0,15 g aus 1,5 g Nebenbasengemisch) konnten nicht zur Krystallisation gebracht werden.

Zahlreiche weitere Versuche, über die halogenwasserstoffsauren Salze, die Pikrate, die Quecksilberchlorid-Doppelsalze oder durch Über-

führung in die Oxime, Semicarbazone und Jodmethylate eine Trennung der Nebenbasen zu erreichen, führten nicht zum Ziel.

Will man die *Gesamtalkaloide* aus dem Gift des Feuer- und Alpensalamanders aufarbeiten, so ist es zweckmäßig, nicht wie wir es in den ersten Aufarbeitungen taten, das Samandarin zuerst zum Teil als Base und dann den Rest als Chlorhydrat abzutrennen, sondern von vornherein das ganze Samandarin als Chlorhydrat und den in der Mutterlauge vorhandenen Rest als Bromhydrat zu gewinnen.

Man löst zu diesem Zweck z. B. 34 g der ätherlöslichen Rohbasen in 65 ccm 2 n-Salzsäure und 140 ccm Wasser heiß und erhält beim Erkalten als erste Krystallisation 23,4 g Samandarin-chlorhydrat vom Schmelzp. 298° und nach dem Eindampfen der Mutterlauge i. V. auf 100 ccm weitere 2,3 g vom schlechten Schmelzp. 280°. Durch zweimaliges Umkrystallisieren aus Wasser werden aus den beiden Fraktionen insgesamt 20,0 g reines Samandarin-chlorhydrat erhalten. Die Mutterlaugen von der Umkrystallisation können durch Einengen weiter auf Samandarin-chlorhydrat verarbeitet werden; aus der letzten Mutterlauge wird über die freie Base 0,5 g Samandaron gewonnen.

Die ursprüngliche salzsaure Mutterlauge wird, wie vorstehend beschrieben, mit Kaliumbromid versetzt und weiteres Samandarin als Bromhydrat und schließlich Samandaron erhalten, das in einigen Fällen auch schon das Samandarin-chlorhydrat als Chlorhydrat begleitete. Die Trennung erfolgte dann durch Umkrystallisation aus Wasser, in dem das Samandarin-chlorhydrat schwerer löslich ist.

Aufarbeitung der bei der Darstellung von Samandarin-chlorhydrat aus S. atra erhaltenen Chlorhydratrückstände[1]).

Während bei S. maculosa die Alkaloidmutterlaugen aus Männchen und Weibchen gemeinsam aufgearbeitet wurden, wurde bei S. atra das Gift aus den Männchen und Weibchen getrennt aufgearbeitet, wobei sich ergab, daß nur im ersteren Falle Samandaridin isoliert werden konnte.

3,2 g der aus S. atra ♂ nach Abtrennung des Samandarin-chlorhydrates erhaltenen Basen geben beim Anreiben mit 5 ccm Wasser als Rückstand 0,21 g eines uneinheitlichen Chlorhydrats, das ab 307° sinterte und bei 309—311° unter Zersetzung schmolz. Beim Umkrystallisieren aus 4 ccm Wasser wurden hieraus 0,1 g Samandaridin-chlorhydrat vom Schmelz-

[1]) C. Schöpf u. W. Braun, a. a. O., S. 95.

punkt 342—344° (Zers., Sintern ab 339°) erhalten, aus denen durch alkalisches Ausäthern der wäßrigen Lösung mit viel Äther 0,075 g *Samandaridin* vom Schmelzp. 279—283° (Sintern ab 275°) erhalten wurden, das nach einmaligem Umkrystallisieren aus Äthylalkohol konstant bei 289° schmolz. Aus der wäßrigen Mutterlauge von der ersten Umkrystallisation des rohen Samandaridin-chlorhydrats wurden durch alkalisches Ausäthern 0,08 g einer Base vom Schmelzp. 170—174° erhalten, die aus Äthylalkohol umkrystallisiert 0,05 g Samandarin vom Schmelzp. 184—185° (Mischprobe) ergaben.

Die Mutterlauge vom Anreiben der rohen Chlorhydrate wurde, wie oben beschrieben, über die Bromhydrate weiter verarbeitet, wobei keinerlei Besonderheiten beobachtet wurden. Es konnte auch hier über die freien Basen *Samandaron* als Nebenalkaloid isoliert werden.

Die analoge Aufarbeitung von 3,6 g aus S. atra ♀ nach Abtrennung des Samandarin-chlorhydrats erhaltenen Chlorhydraten ergab neben Samandarin gleichfalls *Samandaron*. Samandaridin konnte in dem zuerst abgeschiedenen Chlorhydrat nicht nachgewiesen werden.

2. Versuche mit Samandaridin.

Eigenschaften und Summenformel des Samandaridins.

Das über das Chlorhydrat vom Schmelzp. 342—343° isolierte und durch Umkrystallisation aus Alkohol gereinigte Samandaridin ist eine farblose, starke Base vom Schmelzp. 289°, die in amorphem Zustand in Äther leicht, in krystallisiertem jedoch sehr schwer löslich und in Wasser und Alkali unlöslich ist. Samandaridin läßt sich aus dem Chlorhydrat quantitativ und sofort krystallin erhalten, wenn man die heiße Lösung des Chlorhydrats mit überschüssigem Ammoniak versetzt. Aus viel Äthylalkohol läßt sich Samandaridin in guter Ausbeute zu regelmäßig ausgebildeten Prismen, die keinen Krystallalkohol enthalten, umkrystallisieren.

Samandaridin entfärbt in verd. Schwefelsäure Permanganat auch in der Siedehitze nicht und nimmt in Eisessig bei Zimmertemperatur sowie bei 90° kein Brom auf. Die Lösung

von Samandaridin in konz. Salzsäure ($d = 1{,}19$) bleibt während mehrerer Wochen vollkommen farblos, während Samandarin unter gleichen Bedingungen die von C. Schöpf und W. Braun[1]) als typisch für reines Samandarin erkannte violette Färbung schon nach einigen Stunden zeigt.

Zur Analyse diente die aus dem Chlorhydrat gewonnene Base nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Alkohol.

3,884, 4,938 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. Abnahme 0,5, 0,3 Proc.): 10,400, 13,145 mg CO_2, 3,110, 4,080 mg H_2O. — 3,593 mg Subst.: 0,124 ccm N (21°, 758 mm). — OCH_3- und S-Bestimmung negativ.

$C_{21}H_{31}O_3N$ (345,2)	Ber.	C 73,00	H 9,05	N 4,06
	Gef.	„ 73,03, 72,62	„ 8,96, 9,25	„ 4,00.

10,7 mg getr. Subst. in 130,5 mg Campher: $\Delta t = 10{,}0°$.

$C_{21}H_{31}O_3N$ Ber. Mol.-Gew. 345,2 Gef. 325.

Polarisation: 0,05758 g Samandaridin (aus Alkohol umkrystallisiert und bei 100° i. Hochv. getr.: 0,2 Proc. Abnahme) in 10 ccm 2 n-Essigsäure gelöst: $\alpha_D = +0{,}34°$; $l = 2$ dcm, $t = 21°$.

$$[\alpha]_D^{21} = +\,29{,}5°.$$

Die Bestimmung des *aktiven Wasserstoffs* nach Zerewitinoff wurde nach der von C. Schöpf und W. Braun[2]) beim Samandarin angegebenen Methode vorgenommen. Nur diente als Grignard-Lösung „Methylmagnesiumjodid zur Zerewitinoff-Bestimmung in Di-isoamyläther" von E. Merck.

In einem Testversuch mit Samandarin wurde die für zwei aktive Wasserstoffatome berechnete Menge Methan bei Zimmertemperatur in 5 Minuten glatt entbunden; beim Erhitzen auf 95° wurde keinerlei Methan mehr abgegeben.

36,1, 35,5 mg Samandaridin (bei 100° i. Hochv. getr.) ergaben bei 17° u. 752 mm bzw. 14° und 753 mm in 10 Minuten 2,53, 2,30, nach 30 Minuten 2,55, 2,33 ccm Methan; bei 95° wurden im Verlauf von insgesamt $2^1/_2$ Stunden weitere 1,54, 1,38, nach insgesamt 3 Stunden 1,58, 1,40 ccm Methan entbunden.

Aktives H bei Zimmertemp.: 1,01, 1,01
bei 95° insges.: 1,62, 1,58.

Bei Zimmertemperatur wird demnach genau die einem aktiven Wasserstoff entsprechende Menge Methan entwickelt. Die in der Wärme darüber hinaus entwickelte Methanmenge (0,6 Mol.) scheint aus einer Zersetzung der Substanz zu stammen. Die präparative Aufarbeitung

[1]) a. a. O., S. 96.

[2]) a. a. O., S. 99.

der Ansätze ergab nämlich, daß kein einheitliches Reaktionsprodukt entstanden war. Neben einer sehr geringen Menge eines aus Alkohol umkrystallisierbaren Chlorhydrats vom Schmelzp. 330° (Sintern ab 326°), dessen Analyse keine deutbaren Werte ergab [gef. nach dem Trocknen bei 90° i. Hochv. (Abnahme 9,4 Proc.) C 68,41 H 11,08], wurde in der Hauptsache ein amorphes Chlorhydrat erhalten.

Die *katalytische Hydrierung* von 9,45 mg i. Hochv. getrocknetem Samandaridin in Eisessig mit Palladium in der Apparatur von Bretschneider und Burger[1]) gelang unter Bedingungen, unter denen des-N-Dimethyl-samandarin glatt 1 Mol. Wasserstoff aufnahm, nicht. Es wurde beim Aufarbeiten das eingesetzte Samandaridin quantitativ zurückgewonnen.

Von *Salzen* des Samandaridins wurden bisher das Chlorhydrat, sowie das Brom- und Jodhydrat und das Nitrat hergestellt, von denen sich das Chlorhydrat wegen seiner Schwerlöslichkeit in Wasser als sehr geeignet zur Reindarstellung des Samandaridins erwiesen hat. Charakteristisch für das bei 343° unter Zersetzung schmelzende *Samandaridin-chlorhydrat* ist seine Neigung, Krystallösungsmittel beim Trocknen nur unvollständig abzugeben; erst nach längerem Erhitzen im Hochvakuum auf 100° werden 2 Mol. Krystallwasser abgegeben. Das wasserfreie Chlorhydrat ist äußerst hygroskopisch und nimmt bei 1-stündigem Stehen an der Zimmerluft glatt wieder 2 Mol. Wasser auf. Hierdurch wird es verständlich, daß das Chlorhydrat des Samandaridins nach dem Trocknen keine gut übereinstimmenden Analysenwerte liefert.

Analyse des Samandaridin-chlorhydrats (lufttrocken mit $2H_2O$):

4,081 mg Subst.: 9,095 mg CO_2, 3,170 mg H_2O. — 5,708 mg Subst.: 1,985 mg AgCl.

$C_{21}H_{33}O_3NCl + 2H_2O$ (417,8)	Ber.	C 60,33	H 8,69	Cl 8,49
	Gef.	„ 60,77	„ 8,70	„ 8,60.

Analyse des getrockneten Samandaridin-chlorhydrats:

96,3 mg Subst. verloren bei 110° i. Hochv. 8,2 mg.

$C_{21}H_{33}O_3NCl + 2H_2O$ (417,8)
Ber. für $2H_2O$ 8,60, Gef. 8,52 Proc. Gewichtsverlust.

4,654, 4,732, 5,004 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. Abnahmen 8,2, 9,0, 5,7 Proc.): 11,315, 11,300, 12,030 mg CO_2, 3,550, 3,630, 3,840 mg H_2O. — 2,883 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. Abnahme 8,0 Proc.): 0,087 ccm N

[1]) Chem. Fabrik **10**, 124 (1937).

(22,5°, 748 mm). — 11,318 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. Abnahme 7,7 Proc.): 4,030 mg AgCl.

	$C_{21}H_{32}O_3NCl$ (381,8)			
Ber.	C 66,02	H 8,45	N 3,67	Cl 9,29
Gef.	„ 66,30, 65,13, 65,54	„ 8,53, 8,58, 8,59	„ 3,43	„ 8,81.

Samandaridin-bromhydrat wird aus der essigsauren Lösung von Samandaridin mit gesättigter Kaliumbromidlösung in Form einheitlicher Prismen vom konstanten Schmelzp. 346° unter Zersetzung ausgefällt. Es ist erwartungsgemäß in Wasser noch schwerer löslich als Samandaridin-chlorhydrat.

Auf analoge Weise wird das *Samandaridin-jodhydrat* erhalten, das durch Umkrystallisieren aus Wasser in Form regelmäßig ausgebildeter Stäbchen vom Zersetzungsp. 315° erhalten wird. Charakteristisch für das Jodhydrat ist die leichte irreversible Abgabe des Krystallwassers; es wird bei einstündigem Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur bereits vollständig unter Verwitterung der Krystalle abgegeben. Das so erhaltene Präparat ist nicht hygroskopisch.

Für die Analyse ist demnach das Jodhydrat des Samandaridins weit besser geeignet als das Chlorhydrat.

Analyse des im Exsiccator 1 Stunde über Schwefelsäure getrockneten Samandaridin-jodhydrats:

4,653, 4,374 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. Abnahme 0,5, 0,0 Proc.): 9,080, 8,555 mg CO_2, 2,870, 2,700 mg H_2O. — 4,840 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. Abnahme 1,0 Proc.): 2,425 mg AgJ.

$C_{21}H_{32}O_3NJ$ (473,2)	Ber. C 53,25	H 6,81	J 26,83
	Gef. „ 53,22, 53,37	„ 6,90, 6,91	„ 27,08.

Zur Darstellung des *Samandaridin-nitrats* löst man 10 mg Samandaridin in 3 ccm $^n/_{10}$-Salpetersäure in der Siedehitze auf. Beim Erkalten scheiden sich 9 mg Samandaridin-nitrat aus, die ab 253° sintern und bei 255° unter Zersetzung schmelzen.

Derivate des Samandaridins.

N-Nitroso-samandaridin. Zu der im Ölbad auf 110° erhitzten Lösung von 20 mg Samandaridin-chlorhydrat in 5 ccm Wasser werden 15 mg Natriumnitrit in wenig Wasser zugegeben. Während der Reaktion wird ein langsamer Kohlendioxydstrom durchgeleitet; in einem angeschlossenen Azotometer ist keinerlei Stickstoffentwicklung zu beobachten. Der im Kolben rasch auftretende Niederschlag wird nach dem Erkalten abgesaugt und gründlich mit viel Wasser gewaschen.

Man erhält 18 mg Nitrosamin, das von 270° ab sintert und bei 274—276° unter Zersetzung schmilzt. Durch Umkrystallisieren aus 5 ccm Äthanol werden 13 mg reines N-Nitroso-samandaridin vom konstanten Schmelzp. 278° (Zers.) erhalten.

4,238 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. keine Abnahme): 10,455 mg CO_2, 3,060 mg H_2O. — 3,787, 2,061 mg Subst.: 0,239, 0,130 ccm N (22°, 18°; 751, 742 mm).

$C_{21}H_{30}O_4N_2$ (374,2)	Ber.	C 67,35	H 8,06	N 7,49
	Gef.	„ 67,30	„ 8,08	„ 7,21, 7,22.

Beim Versuch, N-Nitroso-samandaridin in Pyridin mit Essigsäureanhydrid zu acetylieren, wurde das Ausgangsmaterial quantitativ unverändert mit dem Schmelzp. 278° zurückerhalten.

N-Acetyl-samandaridin. 25 mg Samandaridin werden in 0,4 ccm Pyridin mit 0,1 ccm Essigsäureanhydrid 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Dann wird das Pyridin i. V. bei Raumtemperatur abgedampft und der ölige Rückstand mit 2 ccm Wasser durchgerieben, wobei er krystallin wird. Die so erhaltene Acetylverbindung sintert von 227° ab und schmilzt bei 228—229°. Aus 50-proc. Äthylalkohol werden schließlich 20 mg reines N-Acetyl-samandaridin vom konstanten Schmelzpunkt 229° in Form kurzer, gedrungener, zu Büscheln geordneter Nadelspitzen erhalten. Die Acetylverbindung ist in verdünnter Salzsäure und verdünnter Essigsäure unlöslich.

3,840 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. Abnahme 1,9 Proc.): 10,005 mg CO_2, 3,030 mg H_2O. — 3,130 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. Abnahme 1,7 Proc.): 0,095 ccm N (20°, 758 mm).

$C_{23}H_{33}O_4N$ (387,3)	Ber.	C 71,26	H 8,59	N 3,62
	Gef.	„ 71,05	„ 8,83	„ 3,53.

N-Methyl-samandaridin-jodmethylat. 10 mg Samandaridin werden in 1 ccm Methyljodid gelöst und mit 0,25 ccm 1,5 n-Sodalösung unter häufigem Schütteln 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach einigen Minuten beginnt sich das Jodmethylat teils krystallin, teils amorph abzuscheiden. Zur Aufarbeitung wird mehrmals mit Äther durchgeschüttelt und das am Rande des Reaktionsgefäßes haftende Jodmethylat verrieben, wobei es völlig krystallin wird und gut abgesaugt werden kann. Es werden so 15 mg N-Methyl-samandaridin-jodmethylat erhalten, das von 290° ab sintert und bei 295—297° unter Zersetzung schmilzt. Durch einmaliges Umkrystallisieren aus 1,5 ccm Wasser werden Nadeln vom konstanten Schmelzp. 301° (Zers.) erhalten.

4,313, 3,912, 7,432 mg Subst. verloren bei 40° i. Hochv. 0,232, 0,205, 0,590 mg.

$C_{23}H_{36}O_3NJ + 2H_2O$ (537,2)

Ber. für $2H_2O$ 6,71; gef. 5,40, 5,25, 7,95 Proc. Gewichtsverlust.

4,081, 3,707 mg getr. Subst.: 8,210, 7,460 mg CO_2, 2,700, 2,460 mg H_2O. — 6,842 mg getr. Subst.: 3,190 mg AgJ.

$C_{23}H_{36}O_3NJ$ (501,2)	Ber.	C 55,07	H 7,24	J 25,33
	Gef.	„ 54,87, 54,88	„ 7,40, 7,42	„ 25,20.

Umsetzung mit Semicarbazid und Hydroxylamin. 10 mg Samandaridin-chlorhydrat werden in 1 ccm Alkohol mit einer Lösung von 23 mg Semicarbazid-chlorhydrat und 28 mg Natriumacetat in 0,5 ccm Wasser 6 Stunden auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Beim Abkühlen scheiden sich 9 mg Samandaridin-chlorhydrat (Mischprobe) unverändert neben Hydrazo-dicarbonamid, das aus dem Semicarbazid stammt, ab.

Werden 10 mg Samandaridin in 0,75 ccm Alkohol heiß gelöst und mit 16 mg Hydroxylamin-chlorhydrat und 0,25 ccm 1 n-Natronlauge 3 Stunden auf dem siedenden Wasserbad erhitzt, so werden nach dem Abdampfen des Alkohols durch Zugabe von 1 ccm verdünnter Salzsäure und Fällen mit Ammoniak 10 mg Samandaridin vom Schmelzp. 284 bis 286° (Mischprobe) unverändert zurückerhalten.

Samandaridinsäure und Derivate.

Samandaridinsäure. 10 mg Samandaridin werden in 0,5 ccm absolutem Alkohol heiß gelöst und mit einer titrierten Lösung von 6,5 mg Kaliumhydroxyd in 0,25 ccm abs. Alkohol 2 Stunden auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Die nach dem Abkühlen klare Lösung wird mit 2 ccm Wasser verdünnt und der Alkohol i. V. bei 30° weggenommen. Die gegen Curcuma alkalisch reagierende klare Lösung liefert beim Ansäuern mit 2 n-Essigsäure 10 mg Samandaridinsäure in Form schmaler rechteckiger Prismen, die bei 279° schwach aufschäumen und bei 284—287° schmelzen. Die Mischprobe mit Samandaridin vom Schmelzp. 289° schmilzt bei 285—287°, zeigt also keine Depression. Die Substanz wurde ohne Umkrystallisieren analysiert.

5,288 mg exsiccatortrockne Subst. verloren bei 80° i. Hochv. 0,325 mg.

$C_{21}H_{33}O_4N + H_2O$ (381,3)

Ber. für $1H_2O$ 4,7; gef. 5,3 Proc. Gewichtsverlust.

4,963 mg getr. Subst.: 12,560 mg CO_2, 4,040 mg H_2O.

$C_{21}H_{33}O_4N$ (363,3)	Ber.	C 69,36	H 9,15
	Gef.	„ 69,02	„ 9,11.

Silbersalz der Samandaridinsäure. Die wäßrige Lösung des Kaliumsalzes der Samandaridinsäure, die durch Aufspaltung des Samandaridins nach obiger Vorschrift und Neutralisation des überschüssigen Alkalis durch die genau berechnete Menge sehr verdünnter, titrierter Salpetersäure erhalten wird, liefert mit überschüssiger Silbernitratlösung in der Kälte quantitativ das Silbersalz in Form einheitlicher Tetraeder vom Zersetzungspunkt 205°. In Wasser ist das Silbersalz auch in der Hitze sehr schwer löslich; bei längerem Erhitzen tritt Zersetzung unter Bildung von Silberoxyd ein. Erhitzt man das Silbersalz mit sehr verdünnter Salpetersäure einige Minuten zum Sieden, so krystallisiert beim Erkalten Samandaridin-nitrat aus, das nach vorherigem Sintern von 243° ab bei 245—246° unter Zersetzung schmilzt. Die Mischprobe mit Samandaridin-nitrat vom Zersetzungsp. 255° gibt keine Depression.

Das Silbersalz der Samandaridinsäure wurde entsprechend seiner Zersetzlichkeit ohne Umkrystallisieren analysiert. Analyse des krystallwasserhaltigen Silbersalzes:

4,313, 5,015 mg Subst.: 7,825, 9,100 mg CO_2, 2,740, 3,110 mg HO_2[1]).

$C_{21}H_{32}O_4NAg + 2H_2O$ (506,2)	Ber.	C 49,78	H 7,17
	Gef.	„ 49,50, 49,49	„ 7,11, 6,94.

Analyse des getrockneten Silbersalzes:

4,640, 5,649 mg Subst. verloren bei 80° i. Hochv. 0,294, 0,395 mg.

$C_{21}H_{32}O_4NAg + 2H_2O$ (506,2)
Ber. für $2H_2O$ 7,11; gef. 6,33, 7,01 Proc. Gewichtsverlust.

4,346 mg getr. Subst.: 8,460 mg CO_2, 2,650 mg H_2O[1]). — 5,202 mg getr. Subst.: 1,210 mg Ag.

$C_{21}H_{32}O_4NAg$ (470,2)	Ber.	C 53,59	H 6,84	Ag 22,94
	Gef.	„ 53,12	„ 6,83	„ 23,27.

N-Methyl-samandaridinsäure-jodmethylat. 40 mg Samandaridin werden nach vorstehender Vorschrift in die Saman-

[1]) Die Rückstandsbestimmung konnte bei diesen Analysen nicht durchgeführt werden, weil die Substanz aus dem Schiffchen gekrochen war.

daridinsäure überführt. Die vom Alkohol befreite wäßrige Lösung der Samandaridinsäure in überschüssiger Kalilauge (4 ccm) wird mit 80 mg Dimethylsulfat bei 50° geschüttelt, bis die Lösung gegen Lackmus neutral reagiert, was nach 10 Minuten der Fall ist. Hierauf werden 16 mg Kaliumhydroxyd und weitere 80 mg Dimethylsulfat zugegeben und bei 50° so lange geschüttelt, bis alles Dimethylsulfat verbraucht ist, was nach 15 Minuten der Fall ist.

Die klare, schwach lackmussaure Lösung gibt beim Versetzen mit 3 g Kaliumjodid unter Eiskühlung 52 mg krystallines Jodmethylat, das bei 287° sintert und bei 291—294° unter Aufschäumen schmilzt. Durch einmaliges Umkrystallisieren aus 4 ccm Wasser werden einheitliche Nadeln vom konstanten Schmelzp. 293—294° (unter Aufschäumen, Sintern ab 291°) erhalten. Die Mischprobe mit Samandaridin-jodhydrat vom Schmelzp. 315° beginnt ab 275° unter Braunfärbung zu sintern und schmilzt bei 310° unter Zersetzung.

4,308 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. keine Abnahme): 8,445 mg CO_2, 2,840 mg H_2O.

$C_{23}H_{38}O_4NJ$ (519,2) Ber. C 53,16 H 7,38
Gef. „ 53,46 „ 7,38.

N-Methyl-samandaridinsäure-jodmethylat wird von 2 n-Alkali in der Kälte nicht verändert; beim Erhitzen der alkalischen Lösung scheidet sich dagegen eine amorphe Verbindung ab, die von 206° ab sintert und bei 220—240° unter Braunfärbung schmilzt. Diese Substanz ließ sich nicht krystallin erhalten und wurde nicht weiter untersucht.

Auf in Methanol suspendierte Samandaridinsäure wirkt Diazomethan unter Entfärbung und Stickstoffentwicklung ein. Das Reaktionsprodukt krystallisiert zum Teil; es wurde noch nicht näher untersucht. Samandaridin vom Schmelzp. 289° liefert mit Diazomethan unter gleichen Bedingungen unverändertes Samandaridin vom Schmelzp. 289° (Mischprobe) zurück.

Weitere Versuche mit Samandaridin.

Brom wirkt auf Samandaridin-bromhydrat in Eisessig auch beim kurzen Erwärmen im Wasserbad nicht ein.

Bei einem Versuch, N-Acetyl-samandaridin mit Phosphor und Brom energisch zu bromieren, wurde schon bei Zimmertemperatur viel Bromwasserstoff entwickelt. Das halogenhaltige Reaktionsprodukt, das sich bei 165—175° unter Schwarzfärbung zersetzt, hat sich jedoch nicht zur Krystallisation bringen lassen.

Beim 10-stündigen Erhitzen von 20 mg Samandaridin mit 120 mg Benzaldehyd und 5 mg wasserfreiem Natriumacetat in 1 ccm Essigsäureanhydrid wurden 15 mg N-Acetyl-samandaridin erhalten.

Versuche, Samandaridinsäure in alkalischer Lösung mit Permanganat zu oxydieren, führten zu Abbauprodukten von Säurecharakter, die jedoch wegen der geringen für diese Versuche zur Verfügung stehenden Mengen nicht näher charakterisiert werden konnten.

3. Versuche mit Samandaron.

Eigenschaften und Salze des Samandarons.

Samandaron ist in den meisten organischen Lösungsmitteln sehr viel leichter löslich als Samandarin. Mit verdünnter Salzsäure und verdünnter Schwefelsäure bildet es leicht lösliche Salze. Mit konzentrierter Salzsäure gibt es unter Luftzutritt nicht die für das Samandarin typische Violettfärbung. Die schwefelsaure Lösung der Base entfärbt im Gegensatz zum Samandarin Permanganat in der Kälte in wenigen Sekunden.

Zur Analyse wurde das aus dem Gemisch der Nebenalkaloide isolierte Samandaron aus 35-proc. Aceton umkrystallisiert; es schmolz dann konstant bei 189°.

4,836, 2,828 mg Subst. verloren bei 100° i. Hochv. 0,228, 0,150 mg.

$C_{19}H_{29}O_2N + 1H_2O$ (321,3)
Ber. für $1H_2O$ 5,6; gef. 4,7, 5,3 Proc. Gewichtsverlust.

4,608 mg getr. Subst.: 12,700 mg CO_2, 3,970 mg H_2O. — 2,678 mg getr. Subst.: 0,120 ccm N (26°, 738 mm).

$C_{19}H_{29}O_2N$ (303,3)	Ber.	C 75,17	H 9,64	N 4,62
	Gef	„ 75,17	„ 9,64	„ 4,93.

Polarisation.

a) *Samandaron aus Samandaridin* durch Chromsäureoxydation erhalten (aus 35-proc. Aceton umkrystallisiert; Schmelzp. 189°). 0,07996 g bei 100° i. Hochv. getr. Subst. (Abnahme 5,1 Proc.) in 4,0 ccm Aceton gelöst: $\alpha_D = -2{,}33°$, $l = 1$ dcm, $t = 23°$.

$$[\alpha]_D^{23} = -116{,}6°.$$

b) *Samandaron als Nebenalkaloid* isoliert (aus 35-proc. Aceton umkrystallisiert; Schmelzp. 189°). 0,07263 g bei 100° i. Hochv. getr. Subst. (Abnahme 5,3 Proc.) in 5,0 ccm Aceton gelöst: $\alpha_D = -1{,}68°$, $l = 1$ dcm, $t = 21°$.

$$[\alpha]_D^{21} = -115{,}7°.$$

Samandaron-chlorhydrat. 100 mg Samandaron (aus Samandarin dargestellt) werden in 1,5 ccm absolutem Äthylalkohol gelöst und mit 15-proc. alkoholischer Salzsäure im Überschuß versetzt, wobei sich — auch bei starkem Abkühlen — das Chlorhydrat nicht abscheidet. Durch Zugabe von absolutem Äther werden 100 mg Samandaron-chlorhydrat krystallin ausgefällt, die ab 350° sintern und bei 355° unter Zersetzung schmelzen. Die Überführung in die Base ergibt quantitativ Samandaron vom Schmelzp. 188—190° (Mischprobe) zurück.

Quecksilberchlorid-doppelsalz des Samandarons. Zu der Lösung von 1,2 g Samandaron in überschüssiger Salzsäure (10 ccm Wasser + 2 ccm 2 n-Salzsäure) werden 40 ccm einer kaltgesättigten Lösung von Mercurichlorid gegeben, wobei das Doppelsalz sofort ölig ausfällt. Von dem Öl, das beim Abkühlen erstarrt (1,61 g), wird heiß (80°) abgegossen. Beim Abkühlen scheiden sich 0,84 g zu Büscheln geordnete Nadeln ab, die von 243° ab sintern und bei 245—246° unter Zersetzung schmelzen. Das zuerst ausgefallene und beim Abkühlen erstarrende Öl schmilzt bei 242° unter Zersetzung und gibt mit dem auskrystallisierten Doppelsalz keine Schmelzpunktsdepression. Das Doppelsalz läßt sich aus Wasser umkrystallisieren und schmilzt dann konstant bei 246° unter Zersetzung.

Da durch Natronlauge aus der wäßrigen Lösung des Doppelsalzes die Base nur unvollständig in Freiheit gesetzt wird (es können durch Ausäthern nur 15 Proc. der eingesetzten Base zurückgewonnen werden), wird das Doppelsalz nach dem Verfahren von Thron und Dirscherl[1]) mit phosphoriger Säure zerlegt.

0,4 g wurden in 50 ccm Wasser heiß gelöst, mit 0,5 g phosphoriger Säure versetzt und 5 Minuten zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde von abgeschiedenem Quecksilber abgegossen, mit 2 n-Natronlauge alkalisch gemacht und mit insgesamt 400 ccm Äther ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der Ätherlösung über Natriumsulfat und Verdampfen des Äthers wurden 0,19 g Samandaron vom Schmelzp. 188—190° (Mischprobe) erhalten, was einer Ausbeute von 95 Proc. d. Th., bezogen auf die Summenformel $C_{19}H_{30}O_2NCl + HgCl_2$ entspricht, die in Analogie zu dem entsprechenden Doppelsalz des Samandarins angenommen werden darf.

Das zum Vergleich dargestellte *Quecksilberchlorid-doppelsalz* des *Samandarins* wurde aus der wäßrigen Lösung von Samandarin-chlorhydrat mit überschüssiger Mercurichloridlösung in einer Ausbeute von 98 Proc. d. Th. krystallin ausgefällt. Es schmolz nach dem Umkrystallisieren aus Wasser bei 209° unter Zersetzung.

0,2570 g getr. Subst. (bei 100° i. Hochv. Abnahme 1,9 Proc.): 0,0965 g HgS.

$C_{19}H_{32}O_2NCl + HgCl_2$ (613,5) Ber. Hg 32,68 Gef. Hg 32,40.

[1]) A. 515, 252 (1935).

Die Zerlegung des Doppelsalzes zu Samandarin läßt sich sehr einfach durch alkalisches Ausäthern durchführen; es wird so quantitativ Samandarin vom Schmelzp. 186° zurückerhalten.

Derivate des Samandarons.

Samandaron-semicarbazon. 100 mg Samandaron werden in 2 ccm 2 n-Essigsäure gelöst und hierzu die Lösung von 80 mg Semicarbazidchlorhydrat und 90 mg Natriumacetat in 0,2 ccm Wasser gegeben. Nach 15-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur haben sich 100 mg Samandaron-semicarbazonchlorhydrat abgeschieden, das ab 275° sintert und unter langsamer Braunfärbung bei 350—355° (Zers.) schmilzt. Der restliche Teil des eingesetzten Materials wird durch Extraktion der alkalisch gemachten Mutterlauge mit Chloroform als Samandaron-semicarbazon vom Rohschmelzp. 275—280° (unter Aufschäumen) erhalten.

Zur Zerlegung des Chlorhydrats werden 40 mg in 10 ccm Wasser heiß gelöst und hierzu 1 ccm 2 n-Natronlauge gegeben. Nach dem Abkühlen wird zweimal mit je 40 ccm Chloroform ausgeschüttelt und nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen des Chloroforms so 35 mg Samandaron-semicarbazon erhalten, das von 295° ab sintert und bei 306—308° unter Zersetzung schmilzt. Das in Äther kaum lösliche Semicarbazon läßt sich aus Äthylalkohol zu einheitlichen Prismen vom konstanten Schmelzp. 308° (Zers.) umkrystallisieren.

2,465, 4,187 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. Abnahme 2,4, 1,1 Proc.): 5,940, 10,110 mg CO_2, 2,140, 3,480 mg H_2O. — 2,879 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. Abnahme 2,1 Proc.): 0,372 ccm N (24°, 757 mm).

$C_{20}H_{32}O_2N_4$ (360,3)	Ber. C 66,60	H 8,95	N 15,55
	Gef. „ 65,72, 65,93	„ 9,71, 9,31	„ 14,88.

N-Benzoyl-samandaron-semicarbazon. Zu 100 mg N-Benzoylsamandaron in 3,5 ccm absolutem Alkohol werden 60 mg Semicarbazid-chlorhydrat und 70 mg Natriumacetat in 0,3 ccm Wasser gegeben und das Ganze 3 Stunden auf dem siedenden Wasserbad gekocht. Im Laufe einer Viertelstunde geht noch ungelöstes N-Benzoylsamandaron in Lösung, und nach etwa 1 Stunde beginnt sich das Semicarbazon krystallin abzuscheiden. Es werden so 105 mg erhalten, die ab 253° sintern und bei 255—257° unter Zersetzung schmelzen. Dieser Schmelzpunkt ändert sich nach dem Umkrystallisieren aus viel Äthylalkohol nicht mehr.

3,490, 3,475 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. keine Abnahme): 0,362, 0,394 ccm N (24°, 30°; 750, 749 mm).

$C_{27}H_{36}O_3N_4$ (464,3) Ber. N 12,07 Gef. N 11,86, 12,41.

Samandaron-N-oxalsäureäthylester. Zu 100 mg Samandaron in 1 ccm absolutem Äthanol werden 50 mg frisch destillierter Oxalsäure-diäthylester gegeben und das Ganze unter Feuchtigkeitsausschluß 2 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach Entfernung des Alkohols i. V. bei 25° hinterbleibt ein öliger Rückstand, der beim Anreiben mit absolutem Äther 75 mg Samandaron-N-oxalsäure-äthylester ergibt, die von 145° ab sintern und bei 156—158° schmelzen. Durch Umkrystallisieren aus 0,5 ccm absolutem Äthanol erhält man 50 mg des Esters vom konstanten Schmelzp. 168° (Sintern ab 166°). Die Mischprobe mit Samandaron schmilzt bereits bei 140—145°. Die Verbindung ist in verdünnten Säuren unlöslich.

5,217 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. Abnahme 0,2 Proc.): 13,070 mg CO_2, 3,860 mg H_2O.

$C_{23}H_{33}O_5N$ (403,3) Ber. C 68,45 H 8,25
Gef. „ 68,33 „ 8,28.

Samandaron-N-oxalsäure. 20 mg Samandaron-N-oxalsäureäthylester werden in 1 ccm Äthanol mit 0,6 ccm $^n/_{10}$-Natronlauge versetzt und das Ganze 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Hiernach wird mit 6 ccm Wasser verdünnt, wobei die Lösung klar bleibt, der Alkohol i. V. bei 30° abdestilliert und aus der klaren wäßrigen Lösung mit 2 n-Salzsäure die Säure krystallin ausgefällt (20 mg, die von 120° ab sintern und bei 130—135° unter Aufschäumen schmelzen). Aus 50-proc. Äthylalkohol werden schmale Prismen vom konstanten Schmelzp. 141° (unter Aufschäumen) erhalten.

3,876 mg Subst. verloren bei 80° i. Hochv. 0,266 mg.

$C_{21}H_{29}O_5N + 1{,}5\ H_2O$ (402,3)
Ber. für 1,5 H_2O 6,7; gef. 6,9 Proc. Gewichtsverlust.

3,610 mg getr. Subst.: 8,880 mg CO_2, 2,580 mg H_2O.

$C_{21}H_{29}O_5N$ (375,2) Ber. C 67,16 H 7,79
Gef. „ 67,09 „ 8,00.

Kondensation von Samandaron mit Oxalester und Natriumalkoholat.

Zu 100 mg Samandaron in 9 ccm absolutem Äther werden 240 mg Oxalsäure-diäthylester gegeben, wobei ein Teil des Samandarons ausfällt. Werden nunmehr 110 mg Natriumalkoholat zugegeben, so zeigt schwaches Sieden und Gelbfärbung des Reaktionsgemisches die eintretende Reaktion an. Nach 7-stündigem Erhitzen auf 50° wird das reichlich abgeschiedene gelbe Produkt abgesaugt und gründlich mit absolutem Äther nachgewaschen. Die Substanz wird unter Kühlung in Eiswasser suspendiert, wobei sie teilweise in Lösung geht, und die alkalische Lösung dreimal mit je 40 ccm Äther durchgeschüttelt, wobei 10 mg Harz in den Äther gehen. Dieses Harz liefert bei der Benzoylierung in 0,5 ccm Pyridin mit 40 mg Benzoylchlorid 3 mg N-Benzoylsamandaron vom Schmelzp. 243° (Mischprobe).

Die alkalisch ausgeätherte Lösung wird hierauf mit 2 n-Essigsäure angesäuert und 5-mal mit je 30 ccm Chloroform ausgeschüttelt, und so 63 mg gelbes Harz erhalten, das beim Durchreiben mit absolutem Äther in 35 mg ätherunlösliches pulvriges Produkt, sowie in 24 mg ätherlösliches Harz zerlegt werden kann. Das Harz, das in Wasser praktisch unlöslich ist, löst sich in 2 n-Natronlauge unter Gelbfärbung spielend und läßt sich hieraus mit Ammoniumchlorid wieder als Öl zurückerhalten. Das beim Anreiben mit Äther zurückgebliebene pulvrige Produkt ist in 2 n-Salzsäure sowie in 2 n-Essigsäure unlöslich, dagegen leicht unter gelbroter Färbung in 2 n-Natronlauge. Sättigt man die alkalische Lösung mit Ammoniumchlorid, so tritt lediglich eine schwache Trübung auf. Die Verbindungen konnten nicht zur Krystallisation gebracht werden.

Auch in absolutem Alkohol läßt sich Samandaron bei Gegenwart von Natriumalkoholat mit Oxalester kondensieren. Das in sehr geringer Ausbeute auch krystallisiert erhaltene Reaktionsprodukt gab jedoch bei der Analyse Werte, die mit keiner Theorie in Einklang zu bringen waren.

Die Konstitution des Samandarins*);

von *Clemens Schöpf* und *Kurt Koch*[1])

[mitbearbeitet von *Wilhelm Contzen*[2])].

In der ersten Mitteilung[3]) über die Reindarstellung und die Eigenschaften des *Samandarins*, des Hauptalkaloids im Gift des Feuer- und Alpensalamanders, ist nachgewiesen worden, daß dieses tierische Alkaloid die Summenformel $C_{19}H_{31}O_2N$ besitzt. Samandarin ist eine gesättigte Base mit einem sekundären Stickstoffatom, das einen Ring schließt. Das eine Sauerstoffatom ist ein sekundäres alkoholisches Hydroxyl, das leicht zur Ketogruppe oxydiert werden kann, wobei das Keton *Samandaron* entsteht; das zweite Sauerstoffatom liegt als ringförmig gebundener Äthersauerstoff vor. Die Ätherbrücke läßt sich durch die Einwirkung von Grignard-Verbindungen aufspalten. Die entstehenden Verbindungen, bei der Einwirkung von Methyl-magnesiumjodid das *Methylsamandiol* $C_{20}H_{35}O_2N$, bei der Einwirkung von Phenylmagnesiumbromid das *Phenylsamandiol* $C_{25}H_{37}O_2N$, enthalten außer der ursprünglichen sekundären alkoholischen Hydroxylgruppe nun auch das zweite Sauerstoffatom als sekundäres, zur Ketogruppe oxydierbares Hydroxyl.

1. Desoxysamandarin.

Ersetzt man im Samandarin das alkoholische Hydroxyl mit Bromwasserstoff in Eisessig durch Brom und reduziert dann das Brom mit Zinkstaub in Essigsäure heraus[4]), so erhält man das *Desoxysamandarin* $C_{19}H_{31}ON$. Es wird gleichfalls in guter

*) Herrn Geheimrat H. Wieland zum 65. Geburtstag gewidmet.

[1]) 3. Mitteilung über Salamanderalkaloide; 2. Mitteilung vorstehend.

[2]) Diplomarbeit W. Contzen, Techn. Hochschule Darmstadt 1937.

[3]) C. Schöpf u. W. Braun, A. 514, 69 (1934).

[4]) Diese Versuche sind von Herrn Contzen durchgeführt worden.

Ausbeute erhalten, wenn man im Samandaron durch Erhitzen des Samandaron-semicarbazons oder des N-Benzoyl-samandaron-semicarbazons[1]) mit Natriumalkoholat im Einschlußrohr den Ketonsauerstoff durch Wasserstoff ersetzt. Desoxysamandarin, das man natürlich ebensogut auch als Desoxosamandaron bezeichnen könnte, enthält außer dem Stickstoffatom nur noch das Äthersauerstoffatom.

Beim Hofmannschen Abbau verhält sich Desoxysamandarin wie Samandarin und Samandaron. Es bildet mit Methyljodid unter Anlagerung von zwei Methylgruppen an den sekundären Stickstoff das *N-Methyl-desoxysamandarin-jodmethylat*, das beim Hofmannschen Abbau eine krystallisierte, i. Hochv. unzersetzt destillierbare des-Base, das *des-N-Dimethyl-desoxysamandarin* liefert. In dieser des-Base ist die beim Hofmannschen Abbau entstandene Doppelbindung gegen Mineralsäuren ebenso empfindlich wie die Doppelbindung des des-N-Dimethylsamandarins und -ons. Schon beim kurzen Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure verschwindet die Doppelbindung; die zuerst stark ungesättigte Lösung ist gegen Permanganat stabil geworden. Die Aufarbeitung zeigt, daß bei dieser Behandlung analog wie bei den des-Basen des Samandarins und Samandarons ein Mol. Wasser zum *Oxydihydro-des-N-dimethyl-desoxysamandarin* angelagert worden ist. Auch das Verhalten dieser Oxydihydrobase bei der Oxydation mit Chromsäure entspricht völlig dem Verhalten der Oxydihydrobase aus Samandaron. Es werden wie dort zwei Wasserstoffatome aus dem Molekül entfernt, wobei sich das dem Samandeson analoge *Desoxosamandeson* bildet, von dem weiter unten noch die Rede sein wird.

2. Die Konstitution der des-Basen.

Die Leichtigkeit, mit der die des-Basen des Samandarins, Samandarons und Desoxysamandarins, das des-N-Dimethylsamandarin, das des-N-Dimethyl-samandaron und das des-N-Dimethyl-desoxysamandarin, unter der Einwirkung von verdünnten Mineralsäuren jeweils 1 Mol. Wasser unter Ver-

[1]) Es ist aus dem Gemisch der Nebenalkaloide leicht darstellbar; vgl. die vorstehende 2. Mitteilung.

schwinden der beim Hofmannschen Abbau entstandenen Doppelbindung und Herausbildung einer neuen Hydroxylgruppe zu Oxydihydrobasen anlagern, war außerordentlich überraschend und bis jetzt noch ungeklärt.

Wir können nun eine Erklärung für diese beispiellos leicht erfolgende scheinbare Wasseranlagerung an eine Doppelbindung geben, denn wir fanden, daß in dem aus Samandarin über das N-Methyl-samandarin-jodmethylat und das des-N-Dimethyl-samandarin durch Wasseranlagerung an diese des-Base erhältliche *Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarin* $C_{21}H_{37}O_3N$, nicht nur ein neues Hydroxyl, sondern auch eine *Carbonylgruppe* neu entstanden ist; Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarin gibt mit Hydroxylamin ein *Oxim* und mit Semicarbazid ein *Semicarbazon*. Ebenso gibt das jetzt aus Desoxysamandarin dargestellte Oxydihydro-des-N-dimethyl-desoxysamandarin ein Oxim.

Es entstehen also aus den *des-Basen*, die, wenn man von dem von vornherein vorhandenen Hydroxyl und der beim Hofmannschen Abbau entstandenen Dimethylaminogruppe absieht, eine *Doppelbindung* und ein *Äthersauerstoffatom* enthalten, beim Behandeln mit Mineralsäuren um 1 H_2O reichere *Oxydihydro-des-Basen*, die nun keine Doppelbindung mehr, dafür aber eine neu entstandene *Carbonylgruppe* und ein neu entstandenes *Hydroxyl* enthalten. Ein solcher Übergang ist aber nur dann möglich, wenn die des-Basen *Enoläther* sind, die ja außerordentlich leicht durch Mineralsäuren zu Alkohol und Carbonylverbindung aufgespalten werden[1]).

Wir können demnach jetzt die Formel des des-N-Dimethylsamandarins entsprechend der Teilformel IIIa[2]) auflösen; das Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarin erhält die Teilformel Va. Die des-Basen des Samandarons und des Desoxysamandarins erhalten die Teilformeln IIIb

---

[1]) J. Wislicenus, A. **192**, 119 (1878); A. Faworsky, J. pr. [2] **37**, 534 (1888); L. Knorr, B. **39**, 1409 (1906); A. Zahorka u. K. Weimann, M. **71**, 229 (1938); A. Skrabal u. R. Skrabal, Z. physik. Chem. (A) **181**, 451 (1938).

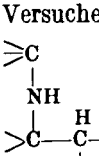
[2]) Die Formeln sind in einer Übersicht am Schluß des theoretischen Teils zusammengestellt.

und c[1]). Für die Oxydihydrobasen gelten entsprechend die Formeln Va—c, die statt der Enoläthergruppe in IIIa—c jeweils eine Carbonylgruppe und das neu entstandene Hydroxyl tragen. Daß diese Oxydihydrobasen auch tautomer als Halbacetale im Sinne der Formeln VIa—c reagieren können, wird weiter unten gezeigt werden. Ebenso wird weiter unten bei der Besprechung des Samandesons der Beweis dafür erbracht werden, daß die Oxydihydrobasen die neu entstandene Carbonylgruppe als Aldehydgruppe enthalten.

Die bei der katalytischen Hydrierung von des-N-Dimethylsamandarin und -on in quantitativer Ausbeute entstehenden *Dihydro-des-Basen* entsprechen den Formeln IVa und b. Es ist ohne weiteres verständlich, daß die Dihydro-des-Basen, die keine Enoläther mehr sind, von Mineralsäuren nicht verändert werden.

3. Die Beziehung zwischen dem Stickstoff und dem Äthersauerstoff und die Konstitution des Methyl- und Phenyl-samandiols.

Damit beim Hofmannschen Abbau des Samandarins, Samandarons und Desoxysamandarins Enoläther entstehen können, muß in diesen Basen der Stickstoff in nächster Nähe des Äthersauerstoffs angreifen. Sieht man von der Möglichkeit ab, daß die Doppelbindung beim Hofmannschen Abbau gewandert sein könnte, was wir durch weiter unten zu schildernde Versuche ausschließen können, so bleiben zwei Möglichkeiten:



der Stickstoff greift entweder entsprechend den Teilformeln Ia—c an *demselben* Kohlenstoffatom an wie die Ätherbrücke, und das benachbarte Kohlenstoffatom trägt noch mindestens ein Wasserstoffatom, das beim Hofmannschen Abbau unter Herausbildung der Doppelbindung als Wasser abgespalten wird, oder aber der Stickstoff greift entsprechend der nebenstehenden Teilformel an einem der Ätherbrücke *benachbarten* Kohlenstoffatom an, und das Kohlenstoff-

[1]) Die Derivate des Samandarins sind in dieser Arbeit mit dem Index *a*, die des Samandarons mit dem Index *b* und die des Desoxysamandarins mit dem Index *c* bezeichnet.

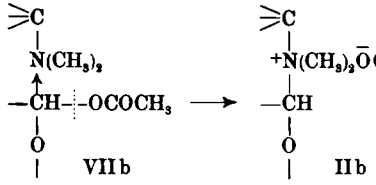
atom, an dem die Ätherbrücke angreift, trägt noch mindestens ein Wasserstoffatom. Von beiden Formeln aus ist die Bildung der des-Basen (IIIa—c) gleich gut verständlich.

Zwischen diesen beiden Möglichkeiten können wir jetzt zugunsten der ersteren (Ia—c) auf Grund der Beobachtung entscheiden, daß beim Kochen von *Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandaron* (Vb), in dem der Stickstoffring und die Ätherbrücke geöffnet sind, mit Essigsäureanhydrid sowohl der Stickstoffring als auch die Ätherbrücke wieder zurückgebildet werden. Es entsteht aus Vb zu rund 40 Proc. d. Th. die quartäre Verbindung IIb ($X = OCO \cdot CH_3$), die auf Zusatz von Jodkali als *N-Methyl-samandaron-jodmethylat* (IIb) isoliert wird. Der Rest des bei diesem Versuch eingesetzten Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarons geht in *des-N-Dimethylsamandaron* (IIIb) über; hierbei wird gleichfalls die Ätherbrücke und daneben die Doppelbindung der des-Base zurückgebildet.

Die *Rückbildung der Ätherbrücke* bei diesen Übergängen beweist einmal, daß das Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandaron im Sinne der Formel VIb als Halbacetal reagieren kann, denn nur von VIb und nicht von der offenen Form Vb aus ist eine Rückbildung der des-Base IIIb durch Wasserabspaltung verständlich. Die leichte Rückbildung der Ätherbrücke in beiden Fällen zeigt ferner, daß der Ring, der den Äthersauerstoff enthält, offenbar räumlich sehr begünstigt ist; es dürfte ein 5- oder 6-Ring, vielleicht aber auch ein sterisch besonders begünstigter noch größerer Ring vorliegen.

Für die Deutung der neben der Rückbildung der Sauerstoffbrücke sich abspielenden *Rückbildung des Stickstoffrings* zum quartären Salz des N-Methyl-samandarons (IIb) ist der Befund wesentlich, daß diese Rückbildung nicht über das gleichzeitig entstehende des-N-Dimethyl-samandaron (IIIb) als Zwischenprodukt geht. Kocht man nämlich dieses mit reinem Essigsäureanhydrid, so bleibt es völlig unverändert. Setzt man dem Essigsäureanhydrid jedoch etwas Eisessig zu, so tritt auch vom des-N-Dimethyl-samandaron aus eine teilweise Rückbildung des Stickstoffrings unter Bildung des quartären Salzes des N-Methyl-samandarons (IIb) ein. Die Ausbeute bleibt aber mit höchstens 25 Proc. d. Th. erheblich hinter der zurück, die

man, wie oben erwähnt, erhält, wenn man Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandaron (Vb bzw. VIb) in gleicher Weise mit Essigsäureanhydrid erhitzt. Man muß daher annehmen, daß die Rückbildung des Stickstoffrings nicht vom des-N-Dimethyl-samandaron (IIIb), sondern von der als Zwischenprodukt nicht isolierten aber zweifellos auftretenden Acetylverbindung der Halbacetalform des Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarons (VIIb) aus in der Weise erfolgt, daß im Sinne der nachstehenden Formeln die Acetoxygruppe sich an die Dimethyl-



aminogruppe zum quartären Salz anlagert. Diese Reaktion ist bekannt; sie entspricht völlig z. B. der Anlagerung von Essigsäuremethylester an Trimethylamin zum Tetramethyl-ammonium-acetat[1]). Daß sie im vorliegenden Falle besonders leicht erfolgt, mag in der größeren Reaktionsfähigkeit des acetalartig gebundenen Acetoxyrestes in VIIb oder in der durch die leichte Rückbildung des Stickstoffrings wahrscheinlich gemachten sterisch günstigen Lage der Acetoxygruppe in VIIb oder in beidem begründet sein. Daß auch das des-N-Dimethyl-samandaron (IIIb) beim Kochen mit Essigsäureanhydrid bei Gegenwart von Eisessig teilweise in das quartäre Salz IIb übergeht, dürfte darauf beruhen, daß hier zuerst Eisessig an die Doppelbindung zu VIIb angelagert wird. Die Acetylverbindung des Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarons (VIIb) dürfte also in jedem Falle das Zwischenprodukt der Reaktion sein.

Die Rückbildung des Stickstoffrings bei den geschilderten Übergängen, die zugleich beweist, daß beim Hofmannschen Abbau keine Wanderung der Doppelbindung eingetreten ist, wäre unverständlich, wenn im Samandarin der Stickstoff nicht im Sinne der Formel Ia an demselben Kohlenstoff-

[1]) R. Willstätter u. W. Kahn, B. 35, 2760 (1902).

atom, das auch die Sauerstoffbrücke trägt, sondern im Sinne der eingangs diskutierten Formel an einem benachbarten Kohlenstoffatom angreifen würde. Wir kommen so zu dem Ergebnis, daß die Konstitution des Samandarins, Samandarons und Desoxysamandarins durch die Teilformeln Ia—c wiederzugeben ist. In diesen Formeln sind nur noch zwei Wasserstoffatome unbewiesen; von ihnen wird weiter unten die Rede sein.

Die auf den ersten Blick überraschenden Aldehydammoniakformeln Ia—c[1]) sind nun weiter auf einem unabhängigen Wege noch dadurch gestützt, daß sie allein das eingangs erwähnte, bisher unverständliche Verhalten des Samandarins und seiner Derivate gegen Grignard-Verbindungen verstehen lassen. Wir hatten beobachtet[2]), daß Samandarin in Äther, also unter sehr milden Bedingungen, glatt mit Methyl-magnesiumjodid und Phenyl-magnesiumbromid reagiert, wobei unter Addition von CH_4 bzw. C_6H_6 *Methyl-* bzw. *Phenyl-samandiol* entsteht, Verbindungen, in denen die Ätherbrücke des Samandarins unter Bildung eines zweiten alkoholischen Hydroxyls aufgespalten worden ist. Wir können jetzt die Reaktionsfähigkeit des Samandarins gegenüber Grignard-Verbindungen als die Reaktion einer durch Aldehydammoniakbildung maskierten Carbonylgruppe auffassen, für die wir Analogien in der Literatur nicht finden konnten, da die Einwirkung von Grignard-Verbindungen auf Aldehydammoniake und Oxazolidine anscheinend noch nicht untersucht worden ist. Die Konstitution des Methyl- und Phenyl-samandiols ist, da sie die NH-Gruppe des Samandarins noch unverändert im Ring enthalten, durch die Formeln XI und XII wiederzugeben. Da Methyl- und Phenyl-samandiol weiter zu Diketonen, dem *Methyl-* und *Phenyl-samandion* (XIII und XIV) oxydierbar sind, so muß das neu entstandene Hydroxyl ein sekundäres sein. An dem Kohlenstoffatom, von dem die Äther-

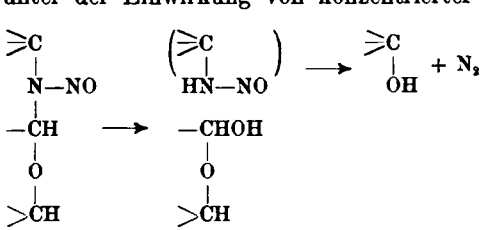
[1]) Die einzige Analogie zu der Aldehydammoniakgruppierung des Samandarins findet sich, soweit wir sehen, unter den Naturstoffen beim *Vomicin*, das nach H. Wieland und Mitarbeitern [A. **527**, 151 (1937); **545**, 59, 112 (1940)] die Gruppe $\geq C—O—CH_2—N<$ enthält.

[2]) C. Schöpf u. W. Braun, A. **514**, 78, 105 (1934).

brücke ausgeht, steht also noch ein Wasserstoffatom, das in den Teilformeln an dem untersten Kohlenstoffatom eingezeichnet ist.

Es war besonders auffallend, daß im des-N-Dimethylsamandarin (IIIa) im Gegensatz zum Samandarin (Ia) die Ätherbrücke ebenso wie auch im Dihydro-des-N-dimethylsamandarin (IVa) gegen Methyl-magnesiumjodid auch unter energischeren Bedingungen, nämlich bei 90—95° in Anisol völlig beständig ist[1]). Auch das ist jetzt verständlich; in IIIa und IVa ist die offenbar allein genügend reaktionsfähige Aldehydammoniak-gruppierung des Samandarins (Ia) nicht mehr vorhanden.

Schließlich können wir noch eine weitere Beobachtung anführen, die gleichfalls nur von der Aldehydammoniakformel Ia des Samandarins aus zu verstehen ist. Behandelt man N-Nitroso-samandarin mit siedender 20-proc. Salzsäure, so wird in wenigen Minuten neben Stickoxyden, die aus durch hydrolytische Abspaltung der Nitrosogruppe gebildeter salpetriger Säure stammen, über 40 Proc. der für 1 Mol. berechneten Menge *Stickstoff* abgespalten. Samandarin verhält sich hierbei also so, als wenn es ein *primäres Amin* wäre. Dies ist nur von der Samandarinformel Ia aus verständlich, in der offenbar unter der Einwirkung von konzentrierter Salzsäure



die Aldehydammoniakgruppierung teilweise entsprechend den vorstehenden Formeln am Stickstoff aufgespalten wird. Das entstehende Zwischenprodukt spaltet wie das Einwirkungsprodukt von salpetriger Säure auf ein primäres Amin sofort

[1]) C. Schöpf u. W. Braun, a. a. O., S. 122—123; ein Teil der Base wird bei dieser Behandlung übrigens auch — wahrscheinlich am alkoholischen Hydroxyl — isomerisiert.

Stickstoff ab. Das zu erwartende stickstofffreie Umwandlungsprodukt hat sich noch nicht krystallisiert erhalten lassen.

Gegen Hydrolyse auch mit Säuren ist Samandarin trotz der sicher nachgewiesenen Aldehydammoniakgruppierung sehr beständig, während die ähnlich konstituierten Oxazolidine sehr leicht durch Säuren hydrolysiert werden[1]). Fünfstündiges Erhitzen der neutralen wäßrigen Lösung des Chlorhydrats auf 140—150°, ja sogar 13-stündiges Erhitzen auf 225° lassen Samandarin unverändert. Auch beim 10-stündigen Kochen mit 10-proc. Überchlorsäure läßt sich der größte Teil des angewandten Samandarins unverändert zurückgewinnen. Erst beim Erhitzen mit 10-proc. Überchlorsäure auf 140—150° wird es angegriffen; die entstandene amorphe Base, die gegen Permanganat stark ungesättigt war und daher auch anscheinend zum Teil das alkoholische Hydroxyl als Wasser abgespalten hatte, war aber nicht zur Krystallisation zu bringen[2]). Auch beim halbstündigen Kochen mit konz. Salzsäure am Rückfluß unter Kohlendioxyd wird Samandarin verändert; aber auch hier hat sich die entstandene Base nicht zur Krystallisation bringen lassen, so daß über die Natur der eingetretenen Veränderungen nichts ausgesagt werden kann. Die geschilderten Befunde sprechen keineswegs gegen die Aldehydammoniakstruktur des Samandarins, denn die an der Aldehydammoniakgruppierung beteiligte Amino- und Hydroxylgruppe muß sich jeweils entsprechend der oben nachgewiesenen leichten Rückbildung des Sauerstoff- und Stickstoffrings in räumlich so günstiger Lage zur Aldehydgruppe befinden, daß, selbst wenn vorübergehend eine Aufspaltung stattfinden sollte, doch anschließend sofort wieder die ja immer spielend leicht erfolgende Aldehydammoniakbildung unter Rückbildung von Samandarin erfolgen muß.

Die abgeleiteten Formeln geben endlich auch die Erklärung für alle übrigen bisher an den besprochenen Verbindungen gemachten Beobachtungen. So wurde gefunden, daß bei der Einwirkung von Methylmagnesiumjodid auf Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarin (Va bzw.

[1]) L. Knorr u. H. Matthes, B. 34, 3484 (1901).

[2]) Die Hydrolyseversuche sind von Herrn W. Contzen ausgeführt worden.

VIa), wobei, wie zu erwarten, 2 Mol. Methan entwickelt werden, ein Teil der angewandten Base unverändert bleibt[1]). Dieser Teil hat offenbar im Sinne der Formel VIa reagiert. Ein Teil reagiert aber offenbar auch als Carbonylverbindung im Sinne der Formel Va, denn Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarin addiert dabei teilweise 1 CH_4 unter Bildung einer Verbindung $C_{22}H_{41}O_3N$, die wir seinerzeit als Jodhydrat vom Schmelzp. 273 bis 275° isoliert haben, und der wir jetzt die Teilformel XV zuerteilen müssen. Die Addition von 1 CH_4 an Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarin beruht also nicht, wie wir früher annahmen, auf einem neuerlichen Reagieren der Ätherbrücke, sondern darauf, daß diese Verbindung im Gegensatz zu der des-Base eine Carbonylgruppe enthält.

Die Teilformel VIb des Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarons läßt verstehen, warum diese Base, wie wir jetzt festgestellt haben, beim Stehen mit Salzsäure in Methanol schon in der Kälte einen *Monomethyläther* bildet, dem wir die Acetalformel VIIIb zuerteilen müssen. Die Bildung dieses Monomethyläthers ist ein weiterer Beweis für die Neigung der Oxydihydrobasen, als Halbacetale im Sinne der Formeln VIa—c zu reagieren.

Im übrigen ist möglicherweise die Halbacetalform VI so begünstigt, daß die Oxydihydro-des-Basen ausschließlich in dieser Form vorliegen. Wir haben diese Möglichkeit, die wir wegen des anschließend zu besprechenden Übergangs des Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarins und -ons in Samandeson für sehr wahrscheinlich halten, und zu deren Gunsten leicht durch die Aufnahme der Absorptionsspektren der Oxydihydro-des-Basen (Fehlen der Carbonylbande in VIa und c) entschieden werden könnte, aber noch nicht näher untersucht. Ebensowenig haben wir bisher die Frage entschieden, ob in dem oben erwähnten Oxim und Semicarbazon des Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarins und im Oxim des Oxydihydro-des-N-dimethyl-desoxysamandarins normale Abkömmlinge der Carbonylform (Va und c) oder Abkömmlinge der Halbacetalform (VIa und c) vorliegen.

Daß Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarin bei der Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin nur eine Monoacetylverbindung liefert[2]), liegt offenbar daran, daß in der zuerst entstehenden, von VIa sich ableitenden Diacetylverbindung der Acetylrest an dem halbacetalartig gebundenen Hydroxyl so leicht verseift wird, daß er schon bei der Aufarbeitung des Acetylierungsgemisches wieder abgespalten wird.

4. Die Konstitution des Samandesols, Samandesons und Desoxosamandesons.

In den abgeleiteten Teilformeln sind durch die vorstehend dargelegten Beobachtungen alle eingezeichneten Atome nach-

[1]) C. Schöpf u. W. Braun, vgl. Anm. 1, S. 69.

[2]) C. Schöpf u. W. Braun, a. a. O., S. 123.

gewiesen mit Ausnahme des Wasserstoffatoms, das an dem gleichzeitig Stickstoff und Sauerstoff tragenden Kohlenstoffatom steht. Der Beweis für dieses Wasserstoffatom, mit anderen Worten dafür, daß Samandarin ein maskierter *Aldehyd* ist, liegt im folgenden:

Wie wir schon früher beobachtet haben, wird Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarin bei der Einwirkung von Chromsäure in schwefelsaurer Lösung über die Zwischenstufe des Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarons unter Abgabe von zwei weiteren Wasserstoffatomen in sehr guter Ausbeute in eine Verbindung $C_{21}H_{33}O_3N$ übergeführt, die wir als *Samandeson* bezeichnet haben. Der Stickstoff des Samandesons liegt auf Grund seiner Bildung aus den des-Basen als Dimethylaminogruppe vor. Von den drei Sauerstoffatomen entspricht nur eines einer Carbonylgruppe, denn Samandeson gibt auch unter energischen Bedingungen in alkalischer Lösung nur ein *Monoxim*. Bei der Einwirkung von Natrium und Alkohol wird ebenso wie durch die reduzierende Wirkung von Natriumalkoholat dieses Carbonyl zu >CHOH reduziert; es entsteht das um 2 Wasserstoffatome reichere *Samandesol*, von dem wir jetzt festgestellt haben, daß es wieder zu Samandeson zurückoxydiert werden kann. Die im Samandesol neu entstandene Hydroxylgruppe haben wir außerdem jetzt mit Methylmagnesiumjodid und durch Acetylierung nachgewiesen; Samandesol ist demnach der dem Keton Samandeson entsprechende Alkohol. Die beiden anderen Sauerstoffatome des Samandesons und Samandesols können nicht als Carbonylgruppen vorliegen, da sie ja sogar gegen die Reduktion mit Natrium und Alkohol beständig sind. Wir haben jetzt festgestellt, daß sie in Form einer *Lactongruppe* vorliegen, die präparativ besonders bequem durch Einwirkung von konzentriertem wäßrigem Ammoniak aufgespalten werden kann. Es entsteht so aus Samandesol unter Aufnahme von 1 H_2O die *Samandesolsäure*, die bereits früher bei der Einwirkung von Natriumalkoholat auf Samandesol und Samandeson, welch letzteres dabei gleichzeitig an der Ketogruppe reduziert wird, isoliert worden war. Samandesolsäure geht leicht unter Wasserabspaltung wieder in das Lacton Samandesol über. Es genügt schon kurzes Erwärmen mit

verdünnter Salzsäure oder Kochen mit Alkohol, um den Lactonring wieder zu schließen. Auch bei der Sublimation i. Hochv. geht Samandesolsäure in Samandesol über; der Übergang findet allerdings erst in der Dampfphase statt, denn nur das Sublimat besteht aus Samandesol, der nicht sublimierte Anteil dagegen besteht auch nach längerem Erhitzen i. Hochv. auf 140—150° noch aus reiner Samandesolsäure. Diese auf den ersten Blick auffallende Beständigkeit der Oxysäure findet ihre einfache Erklärung in der Tatsache, daß die Samandesolsäure außer der Carboxylgruppe und den zwei Hydroxylgruppen noch eine stark basische Dimethylaminogruppe enthält. Samandesolsäure liegt demgemäß als inneres Salz vor, dessen relative Beständigkeit der Tatsache entspricht, daß Salze auch von den Oxysäuren beständig sind, die als freie Oxysäuren sofort in Lactone übergehen.

Im Samandesol und in der Samandesolsäure ist das ursprünglich im Samandarin vorhandene sekundäre alkoholische Hydroxyl wieder zurückgebildet worden, und zwar in derselben sterischen Anordnung, in der es auch im Samandarin vorliegt. Das ist durch folgende Übergänge bewiesen: Acetyliert man Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarin (VIa) mit Essigsäureanhydrid in Pyridin, so erhält man eine Monoacetylverbindung, in der, wie oben erwähnt, offenbar das ursprünglich vorhandene Hydroxyl des Samandarins acetyliert ist, während die in der Halbacetalgruppierung vorliegende Hydroxylgruppe bei der Aufarbeitung den Acetylrest wieder verloren hat. Oxydiert man nun dieses Monoacetyloxydihydro-des-N-dimethyl-samandarin mit Chromsäure in Eisessig[1]), so entsteht das gleiche *Acetylsamandesol*, das auch aus Samandesol bei der Acetylierung erhalten wird. Das im Samandarin ursprünglich vorhandene Hydroxyl ist also bei der Reduktion des Samandesons zum Samandesol in der gleichen sterischen Anordnung wieder zurückgebildet worden. Diese Konfiguration ist offenbar besonders begünstigt, denn wir haben schon früher festgestellt, daß bei der Reduktion der Ketogruppe des des-N-Dimethyl-samandarons das des-N-Dimethyl-samandarin entsteht, also auch hier die Konfiguration der Hydroxylgruppe des Samandarins zurückgebildet wird[2]). Daß dieser Übergang beweist, daß die Carbonylgruppe im des-N-Dimethyl-samandaron nicht in der α,β-Stellung zu der beim Hofmannschen Abbau entstandenen Doppelbindung stehen kann, ist schon früher betont worden.

---

[1]) Diesen Versuch hat F. Ross durchgeführt.

[2]) C. Schöpf u. W. Braun, a. a. O., S. 84, 85.

Aus dem *Samandeson* haben wir jetzt in analoger Weise die *Samandesonsäure* dargestellt. Aus *Desoxysamandarin* läßt sich schließlich auf dem Wege über die des-Base und Oxydihydro-des-Base durch Chromsäureoxydation das *Desoxosamandeson*, $C_{21}H_{35}O_2N$, erhalten, das nur noch die beiden Sauerstoffatome der bei der Oxydation entstandenen Lactongruppe enthält. Desoxosamandeson, das man ebensogut als Desoxysamandesol bezeichnen könnte, bleibt bei der Reduktion mit amalgamiertem Zink und konz. Salzsäure unverändert; es läßt sich in derselben Weise wie Samandesol und Samandeson zu einer Oxysäure, der *Desoxo-samandesonsäure* aufspalten, die ihrerseits auch als Desoxysamandesolsäure bezeichnet werden könnte. Bei der Einwirkung von Hydrazin auf Desoxosamandeson entsteht eine um N_2H_4 reichere Verbindung, die offenbar das Hydrazid der Desoxosamandesonsäure ist.

Die Bildung eines Lactonrings aus einem Hydroxyl und einem Carbonyl der Oxydihydro-des-Basen durch Wegnahme von zwei Wasserstoffatomen kann nicht so erklärt werden, daß zuerst durch Oxydation des Hydroxyls ein Ketoaldehyd entsteht, der dann unter innerer Cannizzaroscher Reaktion ein Lacton bildet, so wie dies 1,5-Ketoaldehyde unter dem Einfluß von Alkali tun[1]), denn im vorliegenden Fall wird das Lacton schon in saurer Lösung gebildet, in der eine Cannizzarosche Reaktion nicht möglich ist. Die Lactongruppe muß also entweder durch Oxydation der bei der Hydrolyse der Enoläthergruppe in den des-Basen entstandenen Carbonylgruppe (vgl. die Formeln Va—c), die demnach eine Aldehydgruppe sein muß, zur Carboxylgruppe und deren Lactonisierung mit der bei der Hydrolyse entstandenen Hydroxylgruppe gebildet werden, oder aber die Lactone entstehen unmittelbar durch Oxydation der Halbacetalform der Oxydihydro-des-Basen (vgl. die Formeln VIa—c), deren Bildungsmöglichkeit oben nachgewiesen worden ist. Letzteres hatte seine Analogie in der Bildung von Estern durch Oxydation der Halbacetale aus Aldehyden und Alkoholen mit Chromsäure[2]). Wir halten die

[1]) H. Meerwein, J. pr. [2] 97, 225 (1918); hierbei entsteht natürlich zuerst die δ-Oxysäure.

[2]) L. Schulz, Ber. Schimmel & Co. 1938, 125.

letztere Möglichkeit für die weit wahrscheinlichere, weil bei der Oxydation des Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarins Samandeson in so guter Ausbeute gewonnen wird, daß die in ihm in der Lactongruppe verestert vorliegende Hydroxylgruppe offenbar von vornherein in einer gegen Oxydation geschützten Form vorliegt. Das ist aber nur dann der Fall, wenn das Gleichgewicht zwischen den tautomeren Formen Va und VIa des Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarins praktisch völlig zugunsten der Halbacetalform VIa liegt. Einerlei aber, welchem Mechanismus die Bildung der Lactone bei der Oxydation der Oxydihydro-des-Basen gehorcht, sie beweist, daß das bei der Hydrolyse der Enoläthergruppe in den des-Basen neu entstandene Carbonyl einer *Aldehydgruppe* angehört. Mit dieser Feststellung ist das letzte in den Teilformeln Ia—c noch nicht diskutierte Wasserstoffatom nachgewiesen und gezeigt, daß Samandarin ein als Aldehydammoniak vorliegender *Aldehyd* ist. Dem Samandesol, Samandeson und Desoxosamandeson kommen die Teilformeln IXa—c, den entsprechenden Säuren die Teilformeln Xa—c zu.

Die Formel IXb für Samandeson erklärt nun auch zwanglos das früher beobachtete Verhalten gegen Methyl-magnesiumjodid[1]). Es wird dabei, wie nach dieser Formel zu erwarten, nur eine weit unter der für 1 Mol. berechneten Menge liegende Menge Methan entwickelt, und eine Substanz gebildet, die dreimal CH_4 addiert hat; für sie kommt nur die Formel XVI in Frage.

Samandesol (IXa) verhält sich gegen Methyl-magnesiumjodid ebenfalls der abgeleiteten Formel entsprechend. Es entwickelt sich, wie wir jetzt festgestellt haben, 1 Mol. Methan, und es entsteht, wie bereits früher gefunden worden war[2]), eine Verbindung, die zweimal CH_4 addiert hat, und der wir eine der Formel XVI analoge Formel zuerteilen müssen, die statt $>C<^{OH}_{CH_3}$ die Gruppe $>C<^{H}_{OH}$ trägt.

Durch die vorstehenden Ergebnisse ist das bisher rätselhafte, durch die Aldehydammoniakstruktur bedingte Verhalten des Samandarins verständlich geworden. Alle im Samandarin und seinen Derivaten sicher nachgewiesenen Atome und Atomverknüpfungen sind in den Teilformeln ein-

[1]) C. Schöpf u. W. Braun, a. a. O., S. 132.
[2]) C. Schöpf u. W. Braun, a. a. O., S. 134.

gezeichnet. Die Kohlenstoffatome müssen dabei noch untereinander durch die übrigen Kohlenstoffatome des Moleküls verknüpft sein, da weder die Öffnung des Stickstoff- noch des Sauerstoffrings zu einem Zerfall des Moleküls führt.

5. Das Kohlenstoffgerüst des Samandarins.

Nach der Aufklärung der Funktion der Sauerstoffatome und des Stickstoffs im Samandarin und ihrer wechselseitigen Beziehungen ist als nächste Frage die nach der Natur des Kohlenstoffgerüsts des Samandarins zu beantworten. Denkt man sich im Samandarin das Hydroxyl durch Wasserstoff, den Äthersauerstoff und die NH-Brücke jeweils durch zwei Wasserstoffatome ersetzt, so erhält man für den Grundkohlenwasserstoff des Samandarins die Summenformel $C_{19}H_{34}$, die sich von der des entsprechenden gesättigten aliphatischen Kohlenwasserstoffs $C_{19}H_{40}$ um eine Differenz von 6 Wasserstoffatomen unterscheidet. Da Samandarin gesättigt ist, muß es demnach *drei carbocyclische Ringe* enthalten.

Um die Natur dieses Ringsystems aufzuklären, haben wir die Dehydrierung des Samandarins mit Selen untersucht. Dabei erhielten wir einen Kohlenwasserstoff, der bei der Destillation über Natrium bei 85—95° Badtemperatur unter 0,003 mm überging. Es ist uns nicht gelungen, den Kohlenwasserstoff selbst oder sein Pikrat krystallisiert zu erhalten. Ebensowenig haben wir durch Nitrierung, Bromierung und energische Oxydation mit Permanganat, dem gegenüber der Kohlenwasserstoff sich bei Zimmertemperatur als gesättigt erweist, oder Salpetersäure ein krystallisiertes Umwandlungsprodukt erhalten können, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß diese Versuche bisher jeweils nur mit wenigen Milligramm Substanz durchgeführt werden konnten. So ist die Einheitlichkeit des Kohlenwasserstoffs noch nicht völlig sichergestellt, wenn auch entsprechend seinem Verhalten bei der Destillation sehr wahrscheinlich. Die Analyse und Molekulargewichtsbestimmung ergab Werte, die unter der Voraussetzung der Einheitlichkeit nur mit der Summenformel $C_{19}H_{24}$, weniger gut auch noch mit der Summenformel $C_{18}H_{22}$ in Einklang zu bringen sind. Da $C_{19}H_{24}$ die wahrscheinlichste Formel ist, so kommt

der Kohlenwasserstoff wohl durch Wasser- und Ammoniakabspaltung aus dem Samandarin zustande nach der Gleichung $C_{19}H_{31}O_2N \rightarrow C_{19}H_{24} + 2H_2O + NH_3$. Da er sich auch durch 8-stündiges Erhitzen mit viel Selen auf 360—370° nicht weiter dehydrieren läßt, so sind in ihm offenbar alle die Ringe, die Sechsringe sind, schon aromatisch. Ein Phenanthrenkohlenwasserstoff, der der Summenformel $C_{19}H_{20}$ oder einem niedrigeren Homologen entsprechen würde, kann nicht vorliegen. Vielmehr zeigen die Analysenwerte, daß der beim Dehydrierungsversuch erhaltene Kohlenwasserstoff ein *Naphtalinkohlenwasserstoff* mit einem weiteren carbocyclischen Ring sein muß. Von den drei ursprünglichen im Samandarin vorhandenen carbocyclischen Ringen liegen demnach zwei als dehydrierbare, zu einem Dekalinsystem verschmolzene Sechsringe vor, während der dritte Ring nicht dehydrierbar, also wahrscheinlich ein Fünf- oder vielleicht auch ein Siebenring ist. Es wird voraussichtlich möglich sein, durch die Dehydrierung von Samandarinderivaten zu weiteren Dehydrierungsprodukten, im Falle des Samandesols vielleicht auch zu Carbonsäuren zu kommen, die weitere Einblicke in die Konstitution des Kohlenstoffskeletts des Samandarins ermöglichen.

Im vorstehenden sind die experimentell gesicherten Ergebnisse über die Konstitution des Samandarins zusammengefaßt. Da es uns in absehbarer Zeit kaum möglich sein wird, die Untersuchung fortzusetzen, so sei es uns gestattet, zum Schluß noch einigen Vermutungen über die möglichen Zusammenhänge des Samandarins mit anderen Naturstoffen Ausdruck zu verleihen, die wir in normalen Zeiten bis zum Vorliegen weiterer experimenteller Ergebnisse zurückgestellt hätten.

Die Hautdrüsen des Feuer- und Alpensalamanders, in denen die Salamanderalkaloide gebildet werden, sind anatomisch und entwicklungsgeschichtlich völlig vergleichbar, also in biologischem Sinne „homolog" mit den Hautdrüsen der Kröten. Es läge nahe anzunehmen, daß diese Drüsen jeweils auch analoge chemische Leistungen vollbringen könnten,

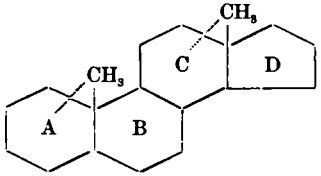
wie das ja tatsächlich bei den Haudtrüsen des Feuer- und des nahe damit verwandten Alpensalamanders der Fall ist, die identische chemische Verbindungen aufbauen, und wie dies auch für die Hautdrüsen verschiedener Krötenarten gilt, die chemisch sehr ähnliche Verbindungen aufbauen. Nach dem, was wir bis jetzt über die Chemie der Krötengifte, die Steranabkömmlinge sind, und deren basischer Begleitstoffe, die Adrenalin oder Tryptaminderivate darstellen, und über die Chemie der Salamandergifte wissen, ist in den chemischen Leistungen der Hautdrüsen dieser im zoologischen System relativ nahe beieinander stehenden Tiere jedoch ein erheblicher Unterschied vorhanden. Die auf Grund der Homologie der Hautdrüsen der Salamander und Kröten naheliegende Vermutung, daß die Salamanderalkaloide Abkömmlinge des Sterans sind, hat sich noch nicht beweisen lassen. Allerdings könnte die violette Farbreaktion, die Samandarin bei der Einwirkung von Luftsauerstoff auf seine Lösungen in konz. Salzsäure zeigt, und die der analogen Farbreaktion der Steranabkömmlinge Solanidin[1]) und Cholsäure sehr ähnlich ist, als ein Hinweis auf die chemische Verwandtschaft dieser Verbindungen gedeutet werden. Auch das gemeinsame Vorkommen von Verbindungen mit 19 und 21 Kohlenstoffatomen (Samandaridin) könnte man als Analogie zur Androstan- bzw. Pregnangruppe deuten. Sollten die weiteren Untersuchungen tatsächlich eine chemische Verwandtschaft des Samandarins mit der Sterangruppe erweisen, so müßte im Samandarin einer der drei Sechsringe des Sterangerüstes (XVII), und zwar einer der außenstehenden Ringe A oder C aufgespalten sein, so daß die beiden übrigbleibenden ein Dekalinsystem bilden. Berücksichtigt man alle am Samandarin und seinen Derivaten gemachten Feststellungen, insbesondere auch die Tatsache, daß im Samandarin höchstens zwei C-Methylgruppen vorhanden sind[2]), so wird es, wie hier nicht im einzelnen diskutiert werden soll, wahrscheinlich, daß neben einer der Methylgruppen an einer der beiden in Formel XVII gekennzeichneten Stellen die

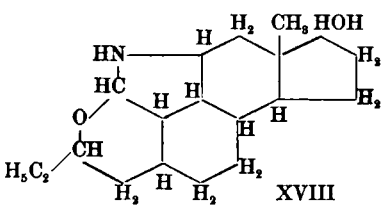
[1]) C. Schöpf u. R. Herrmann, B. **66**, 300 (1933); A. Soltys u. K. Wallenfels, B. **69**, 811 (1936).

[2]) C. Schöpf u. W. Braun, a. a. O., S. 82, 99.

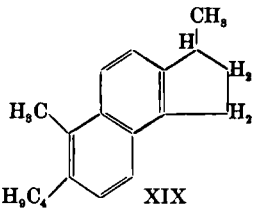
Aufspaltung erfolgte. Eine der drei dann vorhandenen Methylgruppen müßte der maskierten Aldehydgruppe des Samandarins entsprechen. Sucht man nun für die Haftstellen der Sauerstoffatome und des Stickstoffs möglichst solche Stellen am Steranskelett heraus, die auch bei den meisten anderen Steranabkömmlingen Sauerstoff tragen, so wird die Aufspaltung des Ringes A und für Samandarin die Formel XVIII diskutierbar.

XVII





XVIII



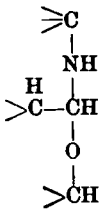
XIX

Diese Formel steht, soweit wir sehen, mit allen bisher am Samandarin und seinen Derivaten gemachten Beobachtungen zwanglos in Einklang und würde auch die Bildung des Kohlenwasserstoffs $C_{19}H_{24}$, dem Formel XIX zukommen könnte, beim Erhitzen des Samandarins mit Selen verstehen lassen. Da die wiedergegebene Formel sich aber nur auf Verdachtsmomente gründet, durchaus hypothetisch ist, und bis jetzt nur eine von zahlreichen weiteren Konstitutionsmöglichkeiten darstellt, so verzichten wir darauf, sie im einzelnen zu diskutieren. Wir haben sie auch nur wiedergegeben, weil wir zur Zeit keine Aussicht sehen, die Untersuchung fortzusetzen, und weil die Diskussion dieser Formel vielleicht Anregungen für spätere experimentelle Arbeiten geben kann. Diesen experimentellen Untersuchungen, die wir sobald als möglich wieder aufzunehmen beabsichtigen, muß die Entscheidung über die Konstitution des Samandarins vorbehalten bleiben.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

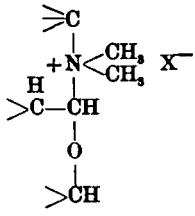
Über-

über die Teilformeln des Samandarins



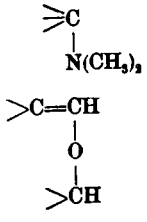
a) $>C<^{H}_{OH}$ b) $>CO$

c) $>CH_2$



a) $>C<^{H}_{OH}$ b) $>CO$

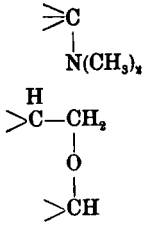
c) $>CH_2$



a) $>C<^{H}_{OH}$ b) $>CO$

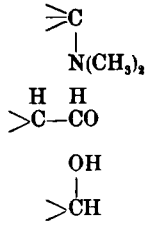
c) $>CH_2$

Ia *Samandarin*	IIa *N-Methyl-samandarin-jodmethylat* (X = J)	IIIa *des-N-Dimethyl-samandarin*
Ib *Samandaron*	IIb *N-Methyl-samandaron-jodmethylat* (X = J)	IIIb *des-N-Dimethyl-samandaron*
Ic *Desoxysamandarin*	IIc *N-Methyl-desoxysamandarin-jodmethylat*	IIIc *des-N-Dimethyl-desoxysamandarin*



a) $>C<^{H}_{OH}$ b) $>CO$

c) $>CH_2$



a) $>C<^{H}_{OH}$ b) $>CO$

c) $>CH_2$

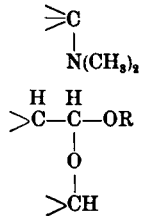
IVa *Dihydro-des-N-dimethyl-samandarin*	Va *Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarin*
IVb *Dihydro-des-N-dimethyl-samandaron*	Vb *Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandaron*
IVc (nicht dargestellt)	Vc *Oxydihydro-des-N-dimethyl-desoxysamandarin*

---

[1]) Die Derivate und Umwandlungsprodukte des Samandarins, die Index *a*, die des Samandarons, die statt dessen eine Carbonylgruppe samandarons), in denen CHOH bzw. CO zu CH_2 reduziert ist, mit dem

sicht

und seiner Umwandlungsprodukte[1]).

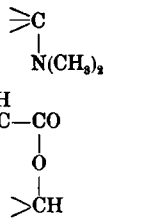


a) $>C<^{H}_{OH}$ b) $>CO$ c) $>CH_2$

VIa—c R = H, tautomere Formen von Va—c

VIIb R = $COCH_3$

VIIIb R = CH_3

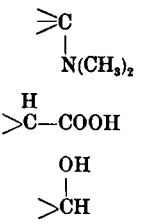


a) $>C<^{H}_{OH}$ b) $>CO$ c) $>CH_2$

IXa *Samandesol*

IXb *Samandeson*

IXc *Desoxosamandeson (= Desoxysamandesol)*

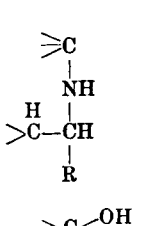


a) $>C<^{H}_{OH}$ b) $>CO$ c) $>CH_2$

Xa *Samandesolsäure*

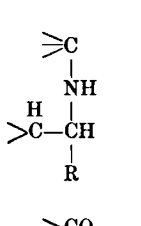
Xb *Samandesonsäure*

Xc *Desoxosamandesonsäure*



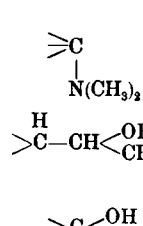
XI R = CH_3, *Methylsamandiol*

XII R = C_6H_5, *Phenylsamandiol*

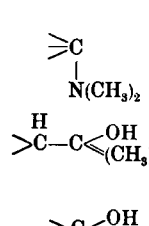


XIII R = CH_3, *Methylsamandion*

XIV R = C_6H_5, *Phenylsamandion*



XV Verbindung $C_{22}H_{41}O_3N$ aus Va mit Methyl-magnesiumjodid



XVI Verbindung $C_{24}H_{45}O_3N$ aus IXb mit Methyl-magnesiumjodid

das alkoholische Hydroxyl des Samandarins enthalten, sind mit dem tragen, mit dem Index *b*, und die des Desoxysamandarins (= Desoxo-Index *c* bezeichnet.

Beschreibung der Versuche.

Versuche mit Oxydihydro-des-N-dimethyl-samandarin (Va).

Oxydihydro-des-N-dimethylsamandarin-oxim (Va, —CH = NOH statt —CHO oder VIa, —NHOH statt —OR). 50 mg Oxydihydro-des-N-dimethylsamandarin werden mit 50 mg Hydroxylamin-chlorhydrat und 50 mg Natriumhydroxyd in 0,8 ccm 50-proc. Alkohol 6 Stunden zum Sieden erhitzt. Man verdünnt dann mit 5 ccm Wasser, nimmt die hierbei aus der curcuma-alkalischen Lösung abgeschiedene amorphe Base in insgesamt 30 ccm Äther auf und erhält aus dem Äther nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen 44 mg wasserklares Harz, das nach zweimaligem Durchreiben mit absolutem Alkohol beim langsamen Eindunstenlassen krystallisiert. Das Oxim schmilzt roh bei 203—205°, nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol konstant bei 204—206° (unter schwachem Aufschäumen; Sintern ab 203°).

4,727 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. keine Abnahme): 11,840 mg CO_2, 4,390 mg H_2O. — 3,304 mg Subst.: 0,214 ccm N_2 (24,5°, 761 mm).

$C_{21}H_{36}O_3N_2$ (366,3) Ber. C 68,80 H 10,45 N 7,65
Gef. „ 68,31 „ 10,39 „ 7,45.

Die Acetylierung des Oxims mit Essigsäureanhydrid in Pyridin ergab ein Harz, das auf keine Weise zur Krystallisation zu bringen war.

Oxydihydro-des-N-dimethylsamandarin-semicarbazon (Va, —CH = N—NH—CO—NH_2 statt —CHO oder VIa, —NH—NH—CO—NH_2 statt —OR). Die heiße Lösung von 100 mg Oxydihydro-des-N-dimethylsamandarin in 1 ccm Alkohol wird mit einer Lösung von 100 mg Semicarbazid-chlorhydrat und 200 mg krystallisiertem Natriumacetat in 0,8 ccm Wasser 4 Stunden zum Sieden erhitzt. Man filtriert dann von wenig abgeschiedenem Hydrazodicarbonamid (Zersetzungsp. 260°), verdünnt mit 5 ccm Wasser und fällt mit 2 n-Natronlauge 90 mg Semicarbazon krystallin aus, das abgesaugt, mit Wasser gewaschen wird, und das ab 160° sintert und bei 163—164° unter Zersetzung schmilzt. Durch Umkrystallisieren aus 2 ccm absolutem Alkohol werden stark verfilzte einheitliche Nadeln vom konstanten Schmelzp. 168—169° (unter Zers.) erhalten.

3,343 mg Subst. verloren bei 80° i. Hochv. 0,284 mg.

$C_{22}H_{40}O_3N_4 + 1C_2H_5OH$ (454,3)
Ber. für $1C_2H_5OH$ 10,1; gef. 8,5 Proc. Gewichtsverlust.

3,059 mg getr. Subst.: 0,360 ccm N_2 (18°, 756 mm).

$C_{22}H_{40}O_3N_4$ (408,3) Ber. N 13,72 Gef. N 13,73.

Beim Versuch, Oxydihydro-des-N-dimethylsamandarin in Alkohol mit Natrium zu reduzieren, wurde im wesentlichen unverändertes Ausgangsmaterial zurückgewonnen, das durch Schmelzpunkt und Mischprobe identifiziert wurde.

Blei(IV)-acetat wirkt auf Oxydihydro-des-N-dimethylsamandarin in Eisessig bei Zimmertemperatur im Laufe von 14 Stunden und bei 60° im Laufe von 1 Stunde praktisch ebensowenig ein wie auf Samandarin und Dihydro-des-N-dimethylsamandarin, die wir gleichfalls geprüft haben. Ebensowenig wurde eine Lösung von Oxydihydro-des-N-dimethylsamandarin und von Samandarin in 2 n-Essigsäure von Überjodsäure im Laufe von 45 Stunden bei Zimmertemperatur und nach 1-stündigem Erwärmen auf 65° angegriffen.

Versuche mit des-N-Dimethylsamandaron (IIIb) und Oxydihydro-des-N-dimethylsamandaron (Vb).

Oxydihydro-des-N-dimethylsamandaron (Vb bzw. VIb). Zur Darstellung des Oxydihydro-des-N-dimethylsamandarons wurde des-N-Dimethylsamandaron verwendet, das nach C. Schöpf und W. Braun[1]) aus N-Methylsamandaron-jodmethylat dargestellt wurde, und das nach dem Umkrystallisieren aus 50-proc. Alkohol in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur bei 145—146° schmolz. Bei genauer Befolgung der Hydratisierungsvorschrift von C. Schöpf und W. Braun[2]) wurde aus dem des-N-Dimethylsamandaron ein Oxydihydro-des-N-dimethylsamandaron erhalten, das als Rohprodukt bei 138° sinterte und bei 140 bis 146° schmolz. Durch Umkrystallisieren aus Petroläther vom Siedep. 60 bis 70° unter Zusatz von wenig Aceton wurde die Base rein erhalten. Sie gibt bei 145° im Schmelzpunktsröhrchen eine trübe Schmelze ohne Meniscusbildung, die erst bei 154—155° sich unter Meniscusbildung klärt. Da diese Beobachtung in Widerspruch zu unseren früheren Angaben steht, wonach das aus Petroläther/Aceton umkrystallisierte Oxydihydro-des-N-dimethylsamandaron konstant bei 139—140° schmilzt, wurde das hier erhaltene Präparat in das *Jodhydrat* überführt, indem es in heißer überschüssiger 1 n-Essigsäure gelöst und mit wäßriger konz. Kaliumjodidlösung im Überschuß versetzt wurde. Es wurden hierbei einheitliche Stäbchen erhalten, die ab 269° sintern und bei 270—272° unter Zersetzung und Braunfärbung schmelzen, nachdem zuvor bei 255° ein schwaches Aufschäumen zu beobachten ist. Der Schmelzpunkt ändert sich auch beim Umkrystallisieren aus Wasser nicht mehr. Auch dieser Befund steht im Widerspruch zur Literaturangabe, wonach das Jodhydrat des Oxydihydro-des-N-dimethylsamandarons konstant bei 245—248° (Sintern ab 239°) schmelzen soll. Ein zum direkten Vergleich herangezogenes Originalpräparat von C. Schöpf und W. Braun des Oxydihydro-des-N-dimethylsamandaron-jodhydrats schmolz bereits bei 240° unter Zersetzung und

[1]) a. a. O., S. 124.

[2]) a. a. O., S. 126.

Braunfärbung; die Mischprobe beider Präparate hatte einen Zersetzungspunkt von 238—239°. Während das jetzt erhaltene Jodhydrat in wohl ausgebildeten einheitlichen Stäbchen krystallisiert, wurde das Jodhydrat von C. Schöpf und W. Braun aus Wasser in Form unregelmäßiger Blättchen ohne scharfe Kanten erhalten; es macht im ganzen einen weniger reinen Eindruck. Die Analyse des Jodhydrats vom Schmelzp. 272° ergibt die erwartete Zusammensetzung.

5,203 mg Subst. (bei 120° i. Hochv. Abnahme 0,7 Proc.): 10,110 mg CO_2, 3,570 mg H_2O.

$C_{21}H_{36}O_3NJ$ (477,3)	Ber.	C 52,82	H 7,60
	Gef.	„ 52,99	„ 7,68.

Zur Überführung in die *Base* werden 1,0 g reines Jodhydrat in 70 ccm heißem Wasser gelöst, rasch gekühlt, mit 2 n-Ammoniak die Base gefällt und ausgeäthert. Die nach dem Trocknen der Ätherlösung über Natriumsulfat und Verdampfen zurückbleibende Base (0,7 g) schmilzt nach dem Umkrystallisieren aus Petroläther vom Siedep. 60—70° unter Zusatz von etwas Aceton konstant bei 145—146° am Rande des Schmelzpunktsröhrchens trüb zusammen; die Schmelze klärt sich bei 156°.

5,483 mg Subst. (bei 40° i. Hochv. Abnahme 0,3 Proc.): 14,540 mg CO_2, 4,960 mg H_2O.

$C_{21}H_{35}O_3N$ (349,3)	Ber.	C 72,14	H 10,10
	Gef.	„ 72,32	„ 10,12.

Für die weiteren Umsetzungen wurde immer derartig gereinigtes Oxydihydro-des-N-dimethylsamandaron verwendet.

N-Methylsamandaron-jodmethylat (IIb) *und des-N-Dimethylsamandaron* (IIIb) *aus Oxydihydro-des-N-dimethylsamandaron* (Vb bzw. VIb). 500 mg Oxydihydro-des-N-dimethylsamandaron vom Schmelzp. 156° werden mit 15 ccm frisch destilliertem Essigsäureanhydrid 2 Stunden zum Sieden erhitzt, wobei die Lösung klar und farblos bleibt. Man destilliert das Essigsäureanhydrid i. V. bei 60° ab, schüttelt den öligen Rückstand mit Äther und überschüssiger Bicarbonatlösung durch, wäscht die Ätherlösung mit Wasser, trocknet über Natriumsulfat und verdampft. Es hinterbleiben 250 mg Nadeln, die von 143° ab sintern und bei 145° schmelzen. Die Mischprobe mit *des-N-Dimethylsamandaron* vom Schmelzp. 146° sintert ab 144° und schmilzt bei 145—146°. Nach dem Umkrystallisieren des somit in einer Ausbeute von 53 Proc. d. Th. erhaltenen des-N-Dimethylsamandarons aus 50-proc. Alkohol schmilzt dieses scharf bei 146° (Mischprobe). Zur

weiteren Identifizierung werden 20 mg in 2 ccm absolutem Äther gelöst und mit 1 ccm Methyljodid nach C. Schöpf und W. Braun[1]) in das *Jodmethylat* überführt. Es schmilzt bei 326° unter Zersetzung und gibt mit des-N-Dimethylsamandaron-jodmethylat vom Schmelzp. 327° (Zers.) keine Depression.

Die bicarbonat-alkalisch ausgeätherte Lösung wird mit 2 n-Essigsäure angesäuert und mit Kaliumjodid gesättigt, wobei auf 60 ccm Lösung 50 g Kaliumjodid angewandt werden. In einer Menge von 240 mg (37 Proc. d. Th.) scheidet sich noch etwas bräunlich verfärbtes *N-Methylsamandaron-jodmethylat* ab, das als Rohprodukt ab 270° sintert und bei 274—276° unter Zersetzung schmilzt. Durch Umkrystallisieren aus Wasser erhält man einheitliche viereckige Brocken, die von 274° ab sintern und bei 275—276° unter Zersetzung schmelzen. Der Schmelzpunkt ändert sich bei nochmaligem Umkrystallisieren nicht mehr. Die Mischprobe mit einem aus Samandaron gewonnenen Vergleichspräparat vom gleichen Schmelzpunkt zeigt keine Depression. Auch die Krystallform ist die gleiche.

5,327, 8,090 mg Subst. verloren bei 120° i. Hochv. 0,149, 0,261 mg. $C_{21}H_{34}O_2NJ + 1H_2O$ (477,2)

Ber. für $1H_2O$ 3,77; gef. 2,8, 3,2 Proc. Gewichtsverlust.

5,178 mg getr. Subst.: 10,375 mg CO_2, 3,440 mg H_2O; 7,829 mg getr. Subst.: 4,085 mg AgJ.

$C_{21}H_{34}O_2NJ$ (459,2)	Ber.	C 54,88	H 7,46	J 27,64
	Gef.	„ 54,65	„ 7,43	„ 28,20.

Bei einer Wiederholung des Versuches wurden aus 1,0 g Oxydihydrodes-N-dimethylsamandaron 0,57 g (60 Proc. d. Th.) des-N-Dimethylsamandaron vom Rohschmelzp. 144° sowie 0,50 g (38 Proc. d. Th.) N-Methylsamandaron-jodmethylat vom Rohschmelzp. 275° erhalten.

Zur weiteren Identifizierung wurden 550 mg des aus Oxydihydrodes-N-dimethylsamandaron gewonnenen N-Methyl-samandaron-jodmethylats in 30 ccm heißem Wasser mit der berechneten Menge einer aus Thalliumsulfat und Bariumhydroxyd bereiteten Thalliumhydroxydlösung heiß versetzt. Nach zweitägigem Stehen wird von gebildetem Thalliumjodid abfiltriert und die klare wäßrige Lösung unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. Der Rückstand spaltet bei 130—140° und 11 mm Druck Wasser ab. Nachdem eine halbe Stunde auf diese Temperatur erhitzt

[1]) a. a. O., S. 124.

wurde, wird nach dem Erkalten die des-Base in Äther aufgenommen, die Ätherlösung mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen über Natriumsulfat eingedampft. Man erhält 376 mg (98,5 Proc. d. Th.) *des-N-Dimethylsamandaron*, das ab 140° sintert und bei 144—145° schmilzt. Durch Umkrystallisieren aus 50-proc. Alkohol erhält man Nadeln, die ab 144° sintern und bei 145—146° schmelzen. Die Mischprobe mit aus Samandaron dargestelltem des-N-Dimethylsamandaron vom Schmelzpunkt 146° sintert ab 144° und schmilzt bei 145—146°, gibt also keine Depression.

Verhalten von des-N-Dimethylsamandaron (IIIb) *gegen Essigsäureanhydrid.* 220 mg im Hochvakuum bei 80° zur Konstanz getrocknetes des-N-Dimethylsamandaron vom Schmelzp. 145—146° werden unter peinlichstem Ausschluß von Feuchtigkeit mit 6,5 ccm zweifach destilliertem Essigsäureanhydrid 2 Stunden zum Sieden erhitzt. Man dampft dann das Essigsäureanhydrid i. V. bei 60° ab, versetzt den öligen Rückstand mit überschüssiger wäßriger Bicarbonatlösung, schüttelt 3-mal mit insgesamt 150 ccm Äther aus, wäscht die Ätherlösung mit Wasser und verdampft nach dem Trocknen über Natriumsulfat. Man erhält so 206 mg (93,5 Proc. d. Th.) des-N-Dimethylsamandaron zurück, das von 139° ab sintert und bei 144—145° schmilzt. Die Mischprobe mit des-N-Dimethylsamandaron vom Schmelzp. 145° gibt keine Depression. Die bicarbonat-alkalisch ausgeätherte wäßrige Lösung wird mit Essigsäure angesäuert, der gelöste Äther im Wasserbad entfernt und die Lösung mit 25 g Jodkalium auf 30 ccm Lösung versetzt. Nach 24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur hatten sich nur wenig amorphe Teilchen abgeschieden. Von den charakteristischen Krystallen des N-Methylsamandaron-jodmethylats war nichts zu sehen. Auch bei 8-tägigem Stehen änderte sich hieran nichts mehr.

Verhalten von des-N-Dimethylsamandaron (IIIb) *gegen Essigsäureanhydrid bei Gegenwart von Eisessig.* 200 mg des-N-Dimethylsamandaron vom Schmelzp. 146° werden in 6 ccm Essigsäureanhydrid und 0,6 ccm Eisessig $2^1/_2$ Stunden zum Sieden erhitzt. Man arbeitet wie in vorstehendem Versuch auf und erhält aus dem Äther 160 mg (80 Proc. d. Th.) unverändertes des-N-Dimethylsamandaron vom Schmelzp. 143 bis 145° (Sintern ab 139°; Mischprobe). Die ausgeätherte bicarbonat-alkalische Lösung wird zusammen mit dem Waschwasser mit Essigsäure angesäuert und mit 25 g Kaliumjodid auf 30 ccm Lösung versetzt. Im Laufe von 2 Tagen scheiden sich 40 mg (16 Proc. d. Th.) einheitliche dünne Nadeln ab, die abgesaugt und mit Wasser gewaschen werden. Sie schmelzen bei 274—275° (Sintern ab 270°); die Mischprobe

mit N-Methylsamandaron-jodmethylat aus Samandaron gibt keine Depression. Wird das Jodmethylat, das bei diesem Versuch erstmalig in Nadeln erhalten wurde, aus Wasser umkrystallisiert, so werden wieder die charakteristischen viereckigen Brocken vom konstanten Schmelzp. 275—276° (Zers.; Mischprobe) erhalten.

Bei einer Wiederholung des Versuches wurden aus 200 mg des-N-Dimethylsamandaron vom Schmelzp. 145—146° 145 mg des-N-Dimethylsamandaron (= 72,5 Proc. der angewandten Menge) vom Schmelzp. 144 bis 145° (Mischprobe) sowie 65 mg N-Methylsamandaron-jodmethylat (25 Proc. d. Th.) vom Schmelzp. 274° in Form einheitlicher dünner Nadeln erhalten. Durch Umkrystallisieren des Jodmethylats aus Wasser wurden wieder die charakteristischen Brocken vom Schmelzp. 275—276° (Zers.; Mischprobe mit N-Methylsamandaron-jodmethylat) erhalten.

Acetalisierung von Oxydihydro-des-N-dimethylsamandaron; *Methyläther* VIIIb. 100 mg Oxydihydro-des-N-dimethylsamandaron werden mit 4 ccm einer 3,1-proc. wasserfreien Lösung von Salzsäuregas in absolutem Methanol 22 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Aus der anfangs klaren Lösung scheiden sich nach $^1/_2$ Stunde wenig amorphe Flocken ab. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung ohne Rücksicht auf die vorhandenen geringen Flocken unter guter Eiskühlung tropfenweise in 12 ccm 1,5 n-Sodalösung gegeben. Das Methanol wird i. V. bei 30—40° verdampft und die amorph abgeschiedene Base in Äther aufgenommen. Die Ätherlösung liefert nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen des Äthers 100 mg Harz, das mit wenig Petroläther (50—60°) angerieben wurde, worin es sich glatt löste, beim langsamen Eindunstenlassen jedoch wieder amorph herauskam. Auch aus Methanol konnte es nicht krystallin erhalten werden.

Zur Überführung in das *Jodhydrat* wird die Base in 1 n-Essigsäure gelöst und unter guter Kühlung mit wäßriger gesättigter Kaliumjodidlösung das Jodhydrat gefällt, das sich im Laufe von 2 Stunden in Form schmaler Blättchen in einer Menge von 85 mg abscheidet. Das rohe Jodhydrat sintert ab 165° und schmilzt bei 169—170° unter Zersetzung. Durch Umkrystallisieren aus Wasser werden einheitliche Blättchen erhalten, die ab 197° sintern, bei 199° aufschäumen und schließlich bei 278—279° sich unter Braunfärbung zersetzen.

Der Schmelzpunkt ändert sich auch nach nochmaligem Umkrystallisieren aus Wasser nicht mehr.

5,085, 4,387 mg Subst. verloren bei 100° i. Hochv. 0,147, 0,178 mg.

$C_{22}H_{40}O_4NJ + 1H_2O$ (527,2)
Ber. für $1H_2O$ 3,4; gef. 2,89, 4,05 Proc. Gewichtsverlust.

4,938 mg getr. Subst.: 9,725 mg CO_2, 3,430 mg H_2O; 4,209 mg getr. Subst.: 1,830 mg AgJ (Methoxylbestimmung).

$C_{22}H_{36}O_3NJ$ (491,2)	Ber.	C 53,75	H 7,80	OCH_3 6,32
	Gef.	„ 53,71	„ 7,77	„ 5,74.

Versuche mit Samandeson (IXb) und Samandesol (IXa).

Samandeson (IXb). Es wurde nach den Angaben von C. Schöpf und W. Braun[1]) gewonnen; den Schmelzpunkt fanden wir jedoch bei 194—195°, also etwas höher als diese Autoren, die 190—192° (Sintern ab 188°) angeben. *Samandeson-jodmethylat* wird erhalten (W. Contzen), wenn man die Lösung von 110 mg Samandeson in 5 ccm absolutem Äther mit 2 ccm Methyljodid stehen läßt. Nach 2-tägigem Stehen versetzt man mit mehr absolutem Äther, saugt ab und krystallisiert aus 96-proc. Alkohol um; Schmelzp. 304—305° (Sintern ab 289°, vorher Braunfärbung).

4,732 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. getr.): 9,320 mg CO_2, 3,180 mg H_2O.

$C_{22}H_{36}O_3NJ$ (489,4)	Ber.	C 53,95	H 7,41
	Gef.	„ 53,72	„ 7,52.

Erhitzt man 20 mg Samandeson mit 6,3 mg o-Phenylendiamin in 0,5 ccm absolutem Alkohol 2 Stunden am Rückfluß, so erhält man beim Eindampfen i. V. durch Anreiben des Rückstands mit absolutem Äther 12 mg Samandeson vom Schmelzp. 192—193° (Sintern ab 189°) und weitere 3 mg von etwas schlechterem Schmelzpunkt unverändert zurück (Mischprobe).

Versuche, Samandeson in Eisessig oder in alkalischer Lösung mit Wasserstoffperoxyd abzubauen, ließen das Samandeson entweder unangegriffen oder ergaben nichtkrystallisierte Reaktionsprodukte.

Samandesonsäure (Xb). Zur Überführung von Samandeson in Samandesonsäure wird die eiskalte Lösung von 50 mg Samandeson in 3 ccm 2 n-Essigsäure in 10 ccm auf 0° gekühltes konz. Ammoniak gegossen, wobei kein Niederschlag auftritt. Nach 4-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird im Vakuumexsiccator zur Trockne verdampft, der krystallisierte

[1]) a. a. O., S. 130.

Rückstand mit wenig Wasser angerieben und das Ungelöste (20 mg) abgesaugt. Die so gewonnene Samandesonsäure schmilzt wie Samandeson bei 194—195°, zeigt aber zum Unterschied von diesem bei 150—153° deutliches Sintern. Mit Samandeson vom Schmelzp. 194—195° wird keine Schmelzpunktsdepression beobachtet. Die Analyse des Rohprodukts zeigt aber, daß hier eine gegenüber dem Samandeson um 1 Mol. Wasser reichere Verbindung vorliegt, die zudem noch $1^1/_2$ Mol. Krystallwasser enthält.

4,743 mg exsiccatortrockne Subst. verloren bei 80° i. Hochv. 0,312 mg.

$C_{21}H_{35}O_4N + 1^1/_2H_2O$ (392,4)
Ber. für $1^1/_2H_2O$ 7,05; gef. 6,58 Proc. Gewichtsverlust.

4,399 mg getr. Subst.: 11,110 mg CO_2, 3,730 mg H_2O.

$C_{21}H_{35}O_4N$ (365,4)	Ber.	C 68,98	H 9,66
	Gef.	„ 68,88	„ 9,49.

Aus dem zum Anreiben verwandten Wasser lassen sich 25 mg Samandeson unverändert zurückgewinnen, wenn man die Lösung, in der das Samandeson vermutlich als Acetat vorliegt, schwach ammoniakalisch macht und ausäthert. Der Ätherrückstand schmilzt ohne vorheriges Sintern bei 192—193° und gibt mit Samandeson keine Schmelzpunktsdepression.

Samandesol (IXa). Die Darstellung erfolgte nach den Angaben von C. Schöpf und W. Braun[1]). Samandesol läßt sich gut durch Lösen in 1 Vol. heißem Aceton und Zusatz von 2,5 Vol. Petroläther vom Siedep. 50 bis 60° umkrystallisieren. Krystallisiert man es aus 50-proc. Methanol um, so schmilzt es bei 171—172° nicht klar wie nach dem Umkrystallisieren aus Aceton, sondern trüb; die Schmelze klärt sich erst bei einer etwa 10° höheren Temperatur. Die Zerewitinoff-Bestimmung, deren präparative Aufarbeitung bereits geschildert ist[2]), wurde von uns wiederholt und ergab die Anwesenheit *eines* aktiven Wasserstoffatoms.

0,0514 g bei 100° i. Hochv. getrocknetes (Abnahme 1,1 Proc.) Samandesol gaben in Anisol bei Raumtemperatur 3,60, nach $^1/_2$-stündigem Erhitzen auf 95° 3,74 ccm Methan (20°, 748 mm; der Blindwert des Lösungsmittels von 0,45 ccm ist bereits abgezogen).

Ber. für 1 aktives H 3,30; gef. 3,43 ccm Methan.

Zur Darstellung des *Jodhydrats* wurde eine Lösung von Samandesol in wenig 2 n-Essigsäure mit konz. wäßriger Jodkaliumlösung versetzt. Da kein Niederschlag auftrat, wurde viel festes Natriumacetat hinzu-

[1]) A. 514, 133 u. 136 (1934). [2]) a. a. O., S. 134.

gefügt, worauf das Jodhydrat in einheitlichen Krystallen ausfiel, die als Rohprodukt bei 248—249° (unter Zers.; Sintern ab 245°), nach dem Umkrystallisieren aus wenig Alkohol konstant bei 272—274° unter Zersetzung schmolzen.

4,222 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. getr.): 8,135 mg CO_2, 2,910 mg H_2O.

$C_{31}H_{36}O_3NJ$ (477,2)	Ber. C 52,81	H 7,60
	Gef. „ 52,55	„ 7,71.

Das *Jodmethylat* des Samandesols wird erhalten, wenn man 50 mg Samandesol in einem Gemisch von 2 ccm absolutem Äther und 1 ccm reinem Aceton mit 0,5 ccm Methyljodid versetzt. Das Jodmethylat krystallisiert bereits nach wenigen Minuten aus; man saugt nach 1-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur ab und krystallisiert die erhaltenen 70 mg aus 2 ccm Wasser um. Das Jodmethylat schmilzt dann konstant bei 297° (unter Zers.; Sintern ab 294°); es enthält 1 Mol. Krystallwasser.

5,422 mg Subst. verloren bei 100° i. Hochv. 0,182 mg.

$C_{32}H_{38}O_3NJ + H_2O$ (509,2)
Ber. für $1\,H_2O$ 3,53; gef. 3,36 Proc. Gewichtsverlust.

5,233 mg getr. Subst.: 10,310 mg CO_2, 3,630 mg H_2O.

$C_{32}H_{38}O_3NJ$ (491,2)	Ber. C 53,75	H 7,80
	Gef. „ 53,73	„ 7,76.

Acetylsamandesol (IXa, statt $=CHOH$: $=CH.OCO.CH_3$). 1. *Aus Samandesol* (IXa). 100 mg Samandesol vom Schmelzpunkt 171° werden mit 10 ccm frisch destilliertem Essigsäureanhydrid 5 Stunden am Rückfluß gekocht. Man dampft dann i. V. zur Trockene, schüttelt den Rückstand mit Äther und verdünnter Bicarbonatlösung durch, äthert mehrmals aus, wäscht mit Wasser, trocknet mit Natriumsulfat und verdampft. Der ölige Ätherrückstand (100 mg) wird 2-mal i. Hochv. aus dem Kugelrohr destilliert; Siedep. 175—180°/0,01 mm (Luftbadtemperatur). Er krystallisiert beim Durchreiben mit Petroläther, schmilzt nach einmaligem Umkrystallisieren aus Petroläther vom Siedep. 60—70° bei 112—114° (Sintern ab 107°), und nach nochmaligem Umkrystallisieren aus dem gleichen Lösungsmittel konstant bei 119—120°.

3,150 mg Subst.: 8,185 mg CO_2, 2,780 mg H_2O.

$C_{23}H_{37}O_4N$ (391,3)	Ber. C 70,53	H 9,53
	Gef. „ 70,87	„ 9,87.

2. *Aus Monoacetyl-oxydihydro-des-N-dimethylsamandarin* (VIa, statt $=CHOH$: $=CH.OCO.CH_3$) (F. Roß). 100 mg Monoacetyl-oxydihydro-des-N-dimethylsamandarin[1]) werden in 1 ccm Eisessig gelöst, mit 0,51 ccm 2 n-Chromsäurelösung in Eisessig versetzt und 3 Stunden auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach 3 Stunden ist die Lösung dunkelgrün gefärbt. Man versetzt mit schwefliger Säure, gibt Natriumacetat hinzu und dampft i. V. zur Trockene. Der Rückstand wird unter Kühlung mit wenig verdünntem Ammoniak versetzt und sofort ausgeäthert, die Ätherlösung mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen mit Natriumsulfat eingedampft. Als Rückstand bleiben 90 mg einer krystallinen farblosen Substanz, die durch harzige Bestandteile verunreinigt ist. Beim Anreiben mit Petroläther vom Siedep. 60—70° bleiben 40 mg krystalline Substanz vom Schmelzp. 105—108° (Sintern ab 90°) zurück. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus Petroläther vom Siedep. 60—70° schmilzt die Substanz bei 112 bis 114° (Sintern ab 107°), also ebenso wie ein einmal umkrystallisiertes Präparat von Acetylsamandesol, mit dem sie keine Schmelzpunktsdepression gibt.

5,282 mg Subst. (bei Zimmertemperatur i. Hochv. Abnahme 0,4 Proc.): 13,585 mg CO_2, 4,440 mg H_2O.

$C_{23}H_{37}O_4N$ (391,3)	Ber.	C 70,53	H 9,53
	Gef.	„ 70,14	„ 9,40.

Oxydation von Samandesol (IXa) *zu Samandeson* (IXb). 100 mg Samandesol vom Schmelzp. 167° werden in 8 ccm 3-proc. Schwefelsäure mit 2 ccm 1 n-Chromsäurelösung im siedenden Wasserbad 3 Stunden erhitzt. Man versetzt mit schwefliger Säure, macht ammoniakalisch und erhält durch Ausäthern 30 mg einer noch mit harzigen Anteilen durchsetzten Base, die nicht näher untersucht wurde. Dann setzt man Weinsäure zu und äthert nochmals ammoniakalisch aus, wodurch 30 mg bereits reines Samandeson vom Schmelzp. 194 bis 195° erhalten werden, die mit einem Vergleichspräparat vom Schmelzp. 194—195° keine Depression geben. Weiteres Ausäthern der ammoniakalischen Lösung im Extraktions-

[1]) Dargestellt nach C. Schöpf u. W. Braun, a. a. O., S. 123.

apparat liefert nochmals 25 mg weniger reines Samandeson vom Rohschmelzp. 183—187°.

Samandesolsäure (Xa) *aus Samandesol.* Die auf 0° abgekühlte Lösung von 36 mg Samandesol in 3 ccm 2 n-Essigsäure gießt man in 10 ccm eisgekühltes konzentriertes Ammoniak. Das zuerst ausfallende Samandesol geht sofort wieder in Lösung. Nach 4-stündigem Stehen bei 0° wird im Vakuumexsiccator eingedampft, wobei sich nach dem Verdampfen des Ammoniaks 35 mg einer einheitlichen krystallisierten Substanz ausscheiden, die als Rohprodukt bereits scharf bei 204—205° unter Aufschäumen schmelzen und mit der Samandesolsäure von Schöpf und Braun keine Depression geben.

Bei der Darstellung größerer Mengen arbeitet man zweckmäßig konzentrierter und mit einem Zusatz von Alkohol. Die eisgekühlte Lösung von 300 mg Samandesol wird in 50 ccm eisgekühltes konz. Ammoniak gegossen. Das ausfallende Samandesol geht nur zum Teil wieder in Lösung; ein Teil scheidet sich krystallin ab[1]). Auf Zusatz von 15 ccm Alkohol geht alles in Lösung. Nach dem Stehen über Nacht bei Zimmertemperatur wird die völlig klare Lösung i. V. eingedampft. Wenn der Alkohol und der größte Teil des Ammoniaks verdampft ist, scheiden sich 235 mg Samandesolsäure aus, die bei 204—205° unter Aufschäumen schmelzen. Beim weiteren Einengen der Mutterlauge wird der Rest etwas weniger rein mit dem Schmelzp. 195—201° (unter Aufschäumen) erhalten. Die erste Fraktion wurde als Rohprodukt analysiert.

5,020 mg Subst. verloren bei 100° i. Hochv. 0,237 mg.

$C_{21}H_{37}O_4N + H_2O$ (385,3)

Ber. für $1H_2O$ 4,67; gef. 4,18 Proc. Gewichtsverlust.

4,783 mg getr. Subst.: 11,920 mg CO_2, 4,390 mg H_2O.

$C_{21}H_{37}O_4N$ (367,3)	Ber.	C 68,62	H 10,15
	Gef.	„ 67,98	„ 10,27.

Die Reinigung der Samandesolsäure durch Umlösen aus konzentriertem Ammoniak ist bereits beschrieben[2]).

---

[1]) Diese Abscheidung des Samandesols hatte anfangs zu der irrigen Ansicht geführt, Samandesol sei „in Alkali völlig unlöslich" (C. Schöpf u. W. Braun, a. a. O., S. 89).

[2]) C. Schöpf u. W. Braun, a. a. O., S. 135.

Samandesolsäure enthält, wie zu erwarten, *drei* aktive Wasserstoffatome.

0,0286 g getr. Subst. (bei 100° i. Hochv. Abnahme 4,9 Proc.) geben in Anisol bei Zimmertemperatur nach 3-stündigem Schütteln 5,70 ccm Methan (20°, 749 mm) nach Abzug des Blindwertes der Apparatur von 0,45 ccm. Die Methanmenge vermehrte sich auch nach einer weiteren Stunde nicht mehr.

Ber. für 3 aktive H 5,24; gef. 5,23 ccm Methan.

Die Aufarbeitung ergab eine Base, die als Rohprodukt unscharf bei 150—157° schmolz; sie ist noch nicht näher untersucht worden.

Gegenüber dem Samandesol zeigt Samandesolsäure sehr große Löslichkeitsunterschiede. Samandesol ist in Wasser unlöslich, dagegen in Methanol, Alkohol und Äther leicht löslich. Samandesolsäure ist dagegen in Wasser merklich, in Methanol und Alkohol sehr schwer löslich.

Lösen von 30 mg Samandesolsäure in 1 ccm 2 n-Essigsäure und 2 ccm Wasser in der Hitze und Fällen mit 2 n-Ammoniak lieferte 30 mg unveränderte Samandesolsäure vom Schmelzp. 205° (Aufschäumen).

Überführung von Samandesolsäure (Xa) *in Samandesol* (IXa). 1. *Durch Sublimation.* Beim Erhitzen i. Hochv. von 0,03 mm sublimiert Samandesolsäure langsam bei 140—150° Badtemperatur. Das Sublimat ist Samandesol vom Schmelzpunkt 171° (Mischprobe); der Rückstand zeigt auch nach längerem Erhitzen noch den Schmelzpunkt der Samandesolsäure (205° unter Aufschäumen).

2. *Mit verdünnter Salzsäure.* Lösen von 30 mg Samandesolsäure in 3 ccm 2 n-Salzsäure, kurzes Kochen, Abkühlen und Fällen mit 2 n-Ammoniak liefert eine Base, die nach dem Aufnehmen in Äther, Trocknen mit Natriumsulfat und Verdampfen bei 171—172° schmilzt (24 mg) und keine Depression mit Samandesol gibt.

3. *Mit alkoholischer Salzsäure.* 100 mg Samandesolsäure werden in 2,5 ccm absolutem Methanol aufgeschlämmt, 6 ccm 6-proc. methanolische Salzsäure zugesetzt und die klare Lösung 20 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Dann gießt man tropfenweise unter guter Kühlung in 15 ccm 1,5 n-Sodalösung und dampft i. V. bei 25—30° Badtemperatur das

Methanol ab, wobei sich Samandesol in einheitlichen Nädelchen vom Schmelzp. 171—172° (trübe Schmelze) abscheidet. Die Mischprobe mit einem aus 50-proc. Methanol umkrystallisierten Präparat von Samandesol vom Schmelzp. 171—172° (trüb; Klärung etwa 10° höher) gab keine Depression. Das erhaltene Samandesol wurde zur Sicherheit nach einmaligem Umkrystallisieren aus 50-proc. Methanol analysiert.

4,852 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. Abnahme 1,3 Proc.): 12,780 mg CO_2, 4,360 mg H_2O. — Methoxyl negativ.

$C_{21}H_{25}O_3N$ (349,3) Ber. C 72,15 H 10,10
Gef. „ 71,83 „ 10,05.

4. *Mit Alkohol.* 100 mg Samandesolsäure werden mit 10 ccm absolutem Alkohol zum Sieden erhitzt. Die zuerst fast unlösliche Verbindung geht im Laufe von 10 Minuten in Lösung. Man kocht noch $^1/_2$ Stunde und dampft dann i. V. ein, wobei als Rückstand 90 mg Samandesol vom Rohschmelzpunkt 168—169° (Mischprobe mit Kontrollpräparat) gewonnen werden. Die Angabe von C. Schöpf und W. Braun, daß ein so gewonnenes Präparat bei 135—138° schmilzt[1]), muß auf einem Irrtum beruhen.

Desoxysamandarin (Ic) und Derivate.

Die Darstellung des Desoxysamandarins (Ic). *1. Aus Samandarin* (Ia) (W. Contzen).

Versucht man, im Samandarin das alkoholische Hydroxyl durch Chlor in der Weise zu ersetzen, daß man in eine Chloroformlösung von Samandarin (100 mg in 3 ccm) gasförmige Salzsäure einleitet, so wird in quantitativer Ausbeute nur das in Chloroform schwer lösliche Chlorhydrat des Samandarins erhalten.

Brom-desoxysamandarin wird erhalten, wenn man 0,5 g Samandarin mit 20 ccm mit Bromwasserstoff gesättigtem Eisessig im nur zu $^1/_3$ gefüllten Bombenrohr $3^1/_2$ Stunden im Wasserbad auf 65—75° erhitzt. Man dampft i. V. zur Trockne, löst den Rückstand in Wasser und äthert die alkalisch gemachte Lösung aus. Die nach dem Trocknen des Äthers mit Natriumsulfat und Verdampfen zurückbleibende Base gibt

[1]) a. a. O., S. 135.

eine starke Beilstein-Reaktion und schmilzt nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus 50-proc. Methanol unter Zusatz von Wasser konstant bei 159—160°. Ausbeute 0,49 g an reinem Produkt.

4,832 mg Subst. (bei 30° i. Hochv. getr.): 11,015 mg CO_2, 3,520 mg H_2O. — 10,489 mg getr. Subst.: 5,440 mg AgBr (n. Carius).

$C_{19}H_{30}ONBr$ (368,3)	Ber.	C 61,96	H 8,21	Br 21,69
	Gef.	„ 62,16	„ 8,15	„ 22,58.

Desoxysamandarin entsteht, wenn 0,17 g Brom-desoxy-samandarin in 5 ccm 50-proc. Essigsäure mit 0,2 g Zinkstaub 3 Stunden am Rückfluß gekocht werden. Man saugt heiß vom unverbrauchten Zinkstaub ab, gießt nach dem Erkalten in viel wäßriges Ammoniak, äthert die ausfallende Base aus und fällt sie aus der mit Natriumsulfat getrockneten ätherischen Lösung mit ätherischer Salzsäure als *Chlorhydrat*, das nach dem Umkrystallisieren aus wenig Wasser Blättchen vom konstanten Schmelzp. 305° (unter Aufschäumen nach vorherigem Sintern) bildet.

2,847 mg Subst. (bei 120° i. Hochv. getr.): 7,270 mg CO_2, 2,450 mg H_2O.

$C_{19}H_{32}ONCl$ (325,9)	Ber.	C 69,64	H 9,63
	Gef.	„ 69,96	„ 9,89.

2. *Aus Samandaron* (Ib). 0,6 g N-Benzoyl-samandaron-semicarbazon, das aus der Aufarbeitung der Mutterlaugen der Nebenalkaloide in größerer Menge zur Verfügung stand[1]), werden mit einer Lösung von 1,2 g Natrium in 15 ccm absolutem Alkohol unter Stickstoff 8 Stunden auf 180—190° im Bombenrohr erhitzt. Man verdünnt mit Wasser, äthert aus, trocknet mit Natriumsulfat und erhält nach dem Verdampfen des Äthers 98 Proc. d. Th. rohes Desoxysamandarin, das zur völligen Reinigung mit ätherischer Salzsäure in das *Chlorhydrat* übergeführt wird. Nach dem Umkrystallisieren aus Wasser erhält man 0,25 g vom bereits konstanten Schmelzpunkt 305° (keine Depression mit dem Präparat aus Brom-desoxy-samandarin). Zur Darstellung der freien *Base* wird die

[1]) Vgl. die vorstehende Arbeit.

wäßrige Lösung des reinen Chlorhydrats mit Ammoniak versetzt und ausgeäthert. Der Äther hinterläßt nach dem Trocknen und Verdampfen bereits reines Desoxysamandarin vom Schmelzpunkt 123°. Es kann aus Petroläther vom Siedep. 45—55° umkrystallisiert werden.

5,236 mg Subst. (bei 40° i. Hochv. Abnahme 0,3 Proc.): 15,100 mg CO_2, 4,990 mg H_2O.

$C_{19}H_{31}ON$ (289,3)	Ber.	C 78,80	H 10,80
	Gef.	„ 78,65	„ 10,66.

N-Methyl-desoxysamandarin-jodmethylat (IIc). 200 mg Desoxysamandarin-chlorhydrat vom Schmelzp. 305° werden in 8 ccm Wasser heiß gelöst, die Lösung sofort mit 3 ccm 1,5-n-Sodalösung versetzt, rasch auf Zimmertemperatur abgekühlt und 5 ccm Methyljodid zugesetzt. Beim intensiven Schütteln löst sich die Base im Methyljodid; nach einer Stunde bildet sich eine starke Emulsion. Nach 2 Tagen, während denen hier und da kräftig geschüttelt wurde, wird mit 50 ccm absolutem Äther das Jodmethylat ausgefällt, abgenutscht und mit viel absolutem Äther nachgewaschen. Durch Umkrystallisieren der erhaltenen 245 mg (95 Proc. d. Th.), die ab 276° sintern und bei 278° unter Zersetzung schmelzen, aus 30 ccm Wasser werden einheitliche Stäbchen vom konstanten Schmelzp. 277 bis 279° (unter Zers.) erhalten.

4,939 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. Abnahme 0,3 Proc.): 10,245 mg CO_2, 3,570 mg H_2O.

$C_{21}H_{36}ONJ$ (445,2)	Ber.	C 56,60	H 8,15
	Gef.	„ 56,57	„ 8,09.

des-N-Dimethyl-desoxysamandarin (IIIc). 400 mg N-Methyl-desoxysamandarin-jodmethylat werden in 120 ccm kohlensäurefreiem Wasser heiß gelöst und hierzu sogleich das aus 400 mg Silbernitrat mit kohlensäurefreier 2 n-Natronlauge frisch gefällte Silberoxyd zugegeben. Unter öfterem guten Schütteln bleibt die Lösung unter Stickstoff bei Zimmertemperatur stehen, bis sie nach 3 Stunden völlig frei von Jodionen ist. Man filtriert vom abgeschiedenen Silberjodid, dampft

bei 60—70° [1]) i. V. unter Stickstoff ein und erhitzt den durch kolloidales Silber braun gefärbten Rückstand bei 13 mm im Luftbad auf 100—120°, wobei die quartäre Base Wasser abzuspalten beginnt. Nach 10 Minuten, während denen die Temperatur auf 150° anstieg, war die Wasserabspaltung beendet. Die des-Base wurde anschließend i. Hochv. von 0,02 mm bei 155—165° Badtemperatur überdestilliert. Es wurden so 240 mg (85 Proc. d. Th.) durchkrystallisierte *des-Base* erhalten, die bei 70—74° (Sintern ab 65°) schmolz.

Zur weiteren Reinigung wurde sie in das *Jodhydrat* übergeführt. Zur Lösung von 330 mg des-Base in 100 ccm Wasser und 10 ccm 2 n-Essigsäure gibt man 10 g Kaliumjodid, worauf das Jodhydrat sofort in einheitlichen Nadeln ausfällt. Man saugt ab, wäscht mit Wasser, in dem das Jodhydrat sehr schwer löslich ist, gut nach und erhält so 450 mg Jodhydrat (98 Proc. d. Th.), das ab 255° sintert und bei 257—258° unter Zersetzung schmilzt. Durch Umkrystallisieren aus 35 ccm Alkohol wird das Jodhydrat in Form einheitlicher Nadeln vom konstanten Schmelzp. 271—272° (unter Zers.; Sintern ab 268°) erhalten.

4,860 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. Abnahme 1,3 Proc.): 10,060 mg CO_2, 3,600 mg H_2O.

$C_{21}H_{36}ONJ$ (445,2)	Ber.	C 56,60	H 8,15
	Gef.	„ 56,45	„ 8,29.

Gießt man die Lösung des Jodhydrats in heißem Alkohol in überschüssiges Ammoniak, kühlt rasch ab und äthert aus, so erhält man nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen des Äthers die freie *des-Base*, die ab 76° sintert und bei 78° scharf schmilzt. Die schwefelsaure Lösung der des-Base entfärbt in der Kälte augenblicklich Kaliumpermanganat. Das Chlorhydrat der des-Base konnte nicht krystallisiert erhalten werden.

---

[1]) Arbeitet man bei höheren Temperaturen (80—90°) im Vakuum, so spaltet schon ein Teil der quartären Base Wasser ab, und im Laufe von etwa 5 Stunden sublimiert die des-Base in einer Menge von etwa 10 Proc. in das Destillationsrohr; sie schmilzt bei 72—76° (Mischprobe).

Oxydihydro-des-N-dimethyl-desoxysamandarin (Vc). 140 mg der über das Jodhydrat gereinigten des-Base vom Schmelzpunkt 78° werden in 30 ccm 3-proc. Schwefelsäure in der Kälte gelöst und die Lösung 2 Stunden auf dem siedenden Wasserbad erhitzt, worauf Kaliumpermanganat von der schwefelsauren Lösung in der Kälte nur noch sehr langsam verbraucht wurde. Da sich aus der heißen Lösung schon bei mäßigem Abkühlen das schwer lösliche Sulfat der Base abscheidet, wird die Lösung noch heiß in überschüssiges Ammoniak und viel fein gemahlenes Eis gegossen. Die abgeschiedene Base wird sofort in Äther aufgenommen, die Ätherlösung getrocknet und der Äther verdampft. Da der Rückstand nur teilweise durchkrystallisiert ist, wird er zur völligen Reinigung in das Jodhydrat übergeführt.

Zur Reinigung werden 125 mg der Rohbase in verdünnter Essigsäure heiß gelöst und heiß mit konz. wäßriger Kaliumjodidlösung versetzt, wobei sich sofort 165 mg (91 Proc. d. Th.) des krystallisierten *Jodhydrats* in Form von Nadeln abscheiden, die ab 268° sintern und bei 272—274° unter Zersetzung schmelzen. Durch einmaliges Umkrystallisieren aus 5 ccm 50-proc. Alkohol erhält man 140 mg einheitliche verfilzte Nadeln vom konstanten Zersetzungspunkt 277° (Sintern ab 275°). Die Mischprobe mit dem Jodhydrat des des-N-Dimethyl-desoxysamandarins schmilzt bei 258—263° unter Zersetzung, gibt also keine deutliche Depression. Die Analyse zeigt aber die Verschiedenheit.

5,173 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. keine Abnahme): 10,415 mg CO_2, 3,830 mg H_2O.

$C_{21}H_{38}O_2NJ$ (463,2)	Ber.	C 54,40	H 8,27
	Gef.	„ 54,91	„ 8,28.

Zur Überführung des Jodhydrates in die Base werden 90 mg in 50-proc. Alkohol heiß gelöst und die Lösung sofort in gut gekühltes überschüssiges 2 n-Ammoniak gegossen. Die ausgeschiedene Base wird in Äther aufgenommen, die Ätherlösung über Natriumsulfat getrocknet und der Äther verdampft. Man erhält 60 mg Oxydihydro-des-N-dimethyl-desoxysamandarin, die langsam durchkrystallisieren und dann bei 122—123° (Sintern ab 120°) schmelzen.

4,738 mg Subst. (bei 40° i. Hochv. Abnahme 0,9 Proc.): 13,135 mg CO_2, 4,590 mg H_2O.

$C_{21}H_{37}O_2N$ (335,3)	Ber.	C 75,16	H 11,12
	Gef.	„ 75,60	„ 10,84.

Oxydihydro-des-N-dimethyl-desoxysamandarin-oxim (Vc, —CH=NOH statt —CHO oder VIc, —NHOH statt —OR). Zur Lösung von 70 mg Oxydihydro-des-N-dimethyl-desoxysamandarin vom Schmelzp. 122° in 0,6 ccm Alkohol gibt man die Lösung von 70 mg Hydroxylamin-chlorhydrat und 70 mg Natriumhydroxyd in 0,6 ccm Wasser und kocht das Ganze 4 Stunden unter Rückfluß. Die auch nach dem Erkalten noch klare Lösung liefert beim Verdünnen mit 5 ccm Wasser 70 mg eines amorphen Niederschlags, der abgesaugt und aus 3 ccm 60-proc. Alkohol unter häufigem Kratzen umkrystallisiert wird, wobei 35 mg krystallisiertes Oxim erhalten werden, das bei 168—169° (Sintern ab 166°) konstant schmilzt.

4,908, 3,262, 2,812 mg Subst. verloren bei 80° i. Hochv. 0,203, 0,134, 0,073 mg.

$C_{21}H_{38}O_2N_2 + 1H_2O$ (368,3)
Ber. für $1H_2O$ 4,9; gef. 4,14, 4,12, 2,6 Proc. Gewichtsverlust.

4,705 mg getr. Subst.: 12,435 mg CO_2, 4,590 mg H_2O. — 3,128, 2,739 mg getr. Subst.: 0,194, 0,179 ccm N_2 (23,5°, 22°; 762, 759 mm).

$C_{21}H_{38}O_2N_2$ (350,3)	Ber.	C 71,94	H 10,93	N 8,00
	Gef.	„ 72,08	„ 10,91	„ 7,16, 7,55.

Desoxo-samandeson (IXc). Die Lösung von 100 mg Oxydihydro-des-N-dimethyl-desoxysamandarin vom Schmelzp. 122° in 20 ccm 3-proc. Schwefelsäure wird mit 29 mg Chromsäureanhydrid 4 Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt. Man reduziert dann die überschüssige Chromsäure mit schwefliger Säure, macht unter guter Eiskühlung mit Ammoniak curcumaalkalisch, äthert mehrfach aus, trocknet und verdampft den Äther und führt die in quantitativer Ausbeute zurückbleibende, nur langsam krystallisierende Base zur Reinigung in das Jodhydrat über. Beim Versetzen der Lösung der Base in verd. Essigsäure mit konz. wäßriger Kaliumjodidlösung fällt das *Jodhydrat* aus, das beim Durchreiben in einheitlichen sternförmig geordneten Nadeln vom Schmelzp. 258° (unter Zers.,

Sintern ab 255°) krystallisiert. Durch Umkrystallisieren von 100 mg aus 4 ccm Wasser, in dem das Jodhydrat wesentlich leichter löslich ist als das Jodhydrat der Oxydihydro-des-Base, werden 75 mg in Blättchen erhalten, die konstant bei 258 bis 259° (unter Zers., Sintern ab 256°) schmelzen.

4,788 mg verloren bei 100° i. Hochv. 0,154 mg.

$C_{21}H_{36}O_2NJ + 1H_2O$ (479,2)
Ber. für $1H_2O$ 3,75; gef. 3,20 Proc. Gewichtsverlust.

4,634 mg getr. Subst.: 9,210 mg CO_2, 3,390 mg H_2O.

$C_{21}H_{36}O_2NJ$ (461,2)	Ber.	C 54,64	H 7,87
	Gef.	„ 54,20	„ 8,18.

Zur Überführung in die freie Base wird das Jodhydrat vom Schmelzp. 258° in Wasser heiß gelöst und unter guter Kühlung mit 2 n-Ammoniak die Base gefällt, die sofort in Äther aufgenommen wird. Die Ätherlösung liefert nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen das freie Desoxo-samandeson, das roh ab 95° sintert und bei 97—99° schmilzt. Durch Umlösen aus Petroläther vom Siedep. 40° wird die Base einheitlich krystallin mit dem konstanten Schmelzp. 99—100° (Sintern ab 98°) erhalten.

5,428 mg Subst. (bei 30° i. Hochv. keine Abnahme): 14,970 mg CO_2, 5,080 mg H_2O.

$C_{21}H_{35}O_2N$ (333,3)	Ber.	C 75,61	H 10,58
	Gef.	„ 75,22	„ 10,47.

Desoxo-samandesonsäure (Xc). Die heiße Lösung von 50 mg Desoxo-samandeson-jodhydrat in 2 ccm Wasser wird in 10 ccm kaltes konz. Ammoniak gegossen, wobei die Base amorph ausfällt. Auf Zusatz von 5 ccm Alkohol geht alles in Lösung. Nach 12-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird der Alkohol und das überschüssige Ammoniak im Vakuumexsiccator weggenommen. Dabei scheidet sich die Desoxo-samandesonsäure krystallisiert aus. Sie wird nach dem Verschwinden des Ammoniakgeruches abgesaugt und mit Wasser gewaschen (30 mg) und schmilzt bei 156—157° unter Aufschäumen. Sie löst sich wie Samandesolsäure in viel konz. Ammoniak.

4,227 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. Abnahme 18,1 Proc., wobei ein Teil sublimierte): 11,065 mg CO_2, 4,070 mg H_2O. — 2,954 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. Abnahme 16,3 Proc., wobei ebenfalls ein Teil sublimierte): 0,104 ccm N_2 (26°, 749 mm).

$C_{21}H_{37}O_3N$ (351,3)	Ber.	C 71,73	H 10,62	N 3,99
	Gef.	„ 71,39	„ 10,77	„ 3,96.

Hydrazid der Desoxo-samandesonsäure (Xc, —CO.NH.NH_2 statt —COOH). 50 mg Desoxo-samandeson-jodhydrat werden mit 0,5 ccm absolutem Alkohol und 0,5 ccm Hydrazinhydrat unter Feuchtigkeits- und Kohlensäureausschluß 4 Stunden auf 100° erhitzt. Beim Verdünnen der klaren Lösung mit 6 ccm Wasser krystallisieren bei Zimmertemperatur im Laufe von etwa 3 Stunden 40 mg des Reaktionsprodukts aus, die ab 137° sintern und bei 142—145° schmelzen. Die in Alkohol leicht lösliche Verbindung wird derart umkrystallisiert, daß 30 mg in 1 ccm absolutem Äther in der Wärme gelöst und hierzu heiß 2,5 ccm Petroläther vom Siedep. 40° zugefügt werden, wobei die Lösung noch klar bleibt; beim Kratzen und Erkalten setzt rasch Krystallisation ein. Es werden so 15 mg gekreuzte Stäbchen erhalten, die konstant bei 152° (Sintern ab 149°) unter schwachem Aufschäumen schmelzen.

3,658 mg Subst. (bei 40° i. Hochv. Abnahme 0,9 Proc.): 9,250 mg CO_2, 3,480 mg H_2O. — 2,183 mg Subst. (bei 40° i. Hochv. Abnahme 4,2 Proc., dabei mechanischer Verlust): 0,210 ccm N_2 (25°, 760 mm).

$C_{21}H_{39}O_2N_3$ (365,3)	Ber.	C 68,98	H 10,76	N 11,50
	Gef.	„ 68,97	„ 10,64	„ 11,02.

Beim Versuch, das Anlagerungsprodukt i. Hochv. zu sublimieren, ging bei 0,01 mm und 125—145° Badtemperatur ein farbloses Öl über, das nicht zur Krystallisation zu bringen war.

Versuche mit Samandarin und N-Nitroso-samandarin.

Verhalten von N-Nitroso-samandarin gegen 20-proc. Salzsäure.

85,1 mg N-Nitroso-samandarin vom Schmelzp. 165° werden mit 10 ccm 20-proc. luftfreier Salzsäure in einem Schliffkölbchen mit Rückflußkühler derart gespalten, daß die dabei entstehenden Gase mit Kohlendioxyd, das aus einem luftfreien Kipp entwickelt wird, in eine mit 50-proc. Kalilauge gefüllte, 20 ccm fassende graduierte Gasbürette übergeführt

werden können. Die Gasbürette steht mit einer Hempelschen Gaspipette in Verbindung, in der das Gas wie bei der van Slyke-Bestimmung durch Schütteln mit einer Permanganatlösung, die auf 1 Liter Wasser 50 g Kaliumpermanganat und 25 g Kaliumhydroxyd enthält, von Stickoxyd befreit werden kann. Wenn in der ganzen Apparatur die Luft durch Kohlendioxyd verdrängt ist, wird die Substanz, ohne daß Luft zutreten kann, in die 20-proc. Salzsäure gegeben, was dadurch erreicht wird, daß die Substanz sich in einem Mikroglasbecher mittels Platindrähten von außen kippbar in dem Reaktionskolben über der Salzsäure befindet. Man verteilt die Substanz durch Schütteln in der Salzsäure und erhitzt zum Sieden, wobei sie rasch bis auf einen sehr geringen Teil, der als Schaum auf der Flüssigkeit schwimmt, mit gelber Farbe in Lösung geht. Beim Sieden geht die gelbe Farbe der Lösung in den ersten 5 Minuten unter Auftreten einer Trübung in Grau über, nach weiteren 5 Minuten färbt sich die Lösung bräunlich und die Hauptmenge des Gases wird entwickelt; zugleich scheiden sich aus der Flüssigkeit Öltröpfchen ab. Im Laufe von weiteren 30 Minuten ist keine Veränderung mehr zu beobachten; in der Gasbürette haben sich wieder Mikroblasen eingestellt. Die entwickelten 4,05 ccm Gas schrumpfen nach mehrmaligem Schütteln mit der alkalischen Permanganatlösung auf das konstante Volumen von 2,60 ccm (21°, 746 mm) zusammen. Bei einem zweiten Versuch unter denselben Versuchsbedingungen ergaben 94,5 mg N-Nitroso-samandarin 2,85 ccm (20°, 747 mm) zur Volumenkonstanz mit alkalischer Permanganatlösung gewaschenes Gas. Die erhaltene Stickstoffmenge beträgt in Procent der für 1 Mol. berechneten Menge im ersten Versuch 43,5 und im zweiten Versuch 41,6 Proc.

Zur Aufarbeitung wurden die beiden Ansätze gemeinsam mit der 3-fachen Menge Wasser verdünnt, und die inzwischen durch Luftoxydation blauviolett gewordene Lösung mit viel Äther ausgeschüttelt, wobei das braune, in der Säure ungelöste Öl nur unvollständig in den Äther ging. Die Ätherauszüge ergaben nach dem Waschen mit wenig Wasser, Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen des Äthers 30 mg eines Harzes, das Krystallisationsansätze zeigte. Dreimaliges Ausschütteln mit Chloroform ergab nach dem Trocknen und Verdampfen des Chloroforms weitere 80 mg Harz, von denen 10 mg in Äther löslich waren. Die salz-

saure Lösung wurde nunmehr mit Natronlauge alkalisch gemacht, wobei die blauviolette Färbung verschwand, und die abgeschiedene amorphe Base in Äther aufgenommen, der nach dem Trocknen und Verdampfen 30 mg einer amorphen Base hinterließ, die ebensowenig wie die vorhergehenden Fraktionen rein erhalten werden konnten.

Wurde Samandarin in gleicher Weise mit konz. Salzsäure behandelt, so entstand, wie zu erwarten, kein Gas. Die salzsaure Lösung gab nach dem Verdünnen mit Wasser und Ausäthern nur etwa 6 Proc. der eingesetzten Menge als Neutralkörper; der Rest wurde nach dem Alkalischmachen als nicht krystallisierte Base erhalten.

Verhalten von Samandarin gegen 10-proc. Überchlorsäure (W. Contzen).

0,1 g Samandarin wurden mit 10 ccm 10-proc. Überchlorsäure unter Stickstoff 4 Stunden am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Danach wurde der Versuch unterbrochen, um fest ausgeschiedene Anteile zu zerkleinern und anschließend die beim Öffnen des Kolbens durch Lufteinwirkung schwach blauviolett gewordene Lösung weitere 3 Stunden am Rückfluß erhitzt, wobei sich Öltröpfchen abschieden. Man verdünnte mit der 10-fachen Menge Wasser, machte die stark schäumende wäßrige Lösung mit Sodalösung alkalisch und gewann durch Ausäthern 0,08 g eines krystallisierten Rückstandes, der nach dem Umkrystallisieren aus einem Gemisch aus gleichen Teilen Äther und Petroläther sich als unverändertes Samandarin erwies. Wurde der gleiche Versuch bei 140 bis 150° im Einschlußrohr durchgeführt, so konnte kein Samandarin mehr isoliert werden; die statt dessen isolierte amorphe Base war in schwefelsaurer Lösung gegen Permanganat stark ungesättigt. Weitere Hydrolyseversuche sind im theoretischen Teil kurz erwähnt.

Das im Zusammenhang mit diesen Versuchen durch Fällen einer Lösung von Samandarin in 2 n-Essigsäure mit 20-proc. Überschlorsäure dargestellte *Samandarin-perchlorat* schmilzt nach dem Umkrystallisieren aus Wasser konstant bei 265° (unter Aufschäumen, Sintern ab 260°).

Die Dehydrierung des Samandarins mit Selen.

1,0 g Samandarin werden mit 3,5 g Selen gut gemischt, in ein weites Reagenzglas gefüllt, mit 1,0 g Selen überschichtet und das Ganze im Metallbad auf 320—330° Badtemperatur erhitzt. Der von 300° ab entweichende Selenwasserstoff wird durch ein Ableitungsrohr an die Flamme eines Bunsenbrenners geführt und so verbrannt. Man erhitzt 2 Stunden auf 300°, 14 Stunden auf 320° und schließlich noch 5 Stunden auf 330°. Die Entwicklung von Selenwasserstoff, die unterhalb 300°

noch nicht merklich ist, wird beim Erhitzen auf 320° ziemlich lebhaft und läßt nach 3-stündigem Erhitzen auf 320° wieder nach. Nach dem Erkalten extrahiert man die an den oberen Teil des Reagenzglases destillierten öligen Substanzen zusammen mit dem Selen erschöpfend mit Äther; die bräunlichgelb verfärbte Ätherlösung zeigt unter der Analysenlampe starke violette Fluorescenz. Man schüttelt sie mehrfach mit verdünnter Salzsäure aus, wobei blaufluorescierende Anteile, die noch nicht näher untersucht sind, in Lösung gehen, dann mit 2 n-Natronlauge, wäscht mit Wasser und erhält nach dem Trocknen des Äthers mit Natriumsulfat und Verdampfen 0,24 g eines Rückstands, der mit wenig metallischem Natrium auf 120—130° erhitzt wird, wobei er unverändert bleibt, und den man anschließend i. Hochv. destilliert. Die Verbindung geht unter 0,003 mm bei 85—95° Badtemperatur als farbloses unter der Analysenlampe violett fluorescierendes Öl über (0,17 g). Eine sehr geringe Menge (0,01 g) destilliert anschließend noch bei 150—160° Badtemperatur. Nach nochmaligem Destillieren der Hauptfraktion über Natrium, wobei der Siedepunkt der gleiche bleibt, wird die Verbindung analysiert.

4,953, 4,498 mg Subst.: 16,385, 14,900 mg CO_2, 4,240, 3,800 mg H_2O. — 10,11 mg Subst. in 99,76 mg Campher: Δt in 2 Proben = 16,3, 16,2°.

$C_{19}H_{24}$ (252,4)	Ber.	C 90,41	H 9,59
$C_{18}H_{22}$ (238,4)	,,	,, 90,70	,, 9,30
	Gef. M = 248,250	,, 90,27, 90,35	,, 9,58, 9,42.

Ein Phenanthrenkohlenwasserstoff der Summenformel $C_{19}H_{20}$ (248,4) hätte 91,88 Proc. C und 8,12 Proc. H; die theoretischen Werte entfernen sich mit dem Hinuntergehen in der homologen Reihe im C, in dem sie steigen, und im H, in dem sie fallen, immer mehr von den gefundenen. Ein Kohlenwasserstoff mit zwei isolierten Benzolkernen und einem carbocyclischen hydrierten Ring der Summenformel $C_{19}H_{22}$ (250,4) hätte 91,14 Proc. C und 8,86 Proc. H; auch hier entfernen sich die theoretischen Werte beim Heruntergehen in der homologen Reihe immer mehr von den gefundenen. Diese Möglichkeiten sind also durch die Analyse ausgeschlossen. Nicht sicher ausgeschlossen wird dagegen die Möglichkeit, daß der Kohlenwasserstoff die Summenformel $C_{17}H_{22}$ (226,3; ber. C 90,20, H 9,80) oder $C_{16}H_{20}$ (212,3; ber. C 90,50, H 9,50) besitzt. Jedoch spricht das gefundene, mit besonderer Sorgfalt bestimmte Molekulargewicht gegen diese Formeln. Ferner müßten tricyclische Kohlenwasser-

stoffe dieser Zusammensetzung ungesättigt sein, was nicht der Fall ist, oder es müßten Naphtalinkohlenwasserstoffe vorliegen, in denen der dritte ursprünglich im Samandarin vorhandene Kohlenstoffring aufgespalten vorliegt, was äußerst unwahrscheinlich ist. Zwei weitere, ebenfalls nach der Analyse noch mögliche Formeln, $C_{14}H_{18}$ (186,3; ber. C 90,26, H 9,74) und $C_{13}H_{16}$ (172,3; ber. C 90,64, H 9,36), die Benzolkohlenwasserstoffen entsprechen würden, und schon wegen des Fehlens der zwei weiteren im Samandarin vorhandenen carbocyclischen Ringe als äußerst unwahrscheinlich angesehen werden müssen, sind durch die Molekulargewichtsbestimmung ausgeschlossen.

Ein Versuch, ein Pikrat des Kohlenwasserstoffs in alkoholischer Lösung herzustellen, mißlang. Bei der Destillation des Kohlenwasserstoffs über Zinkstaub wurde ein öliges Destillat erhalten. Beim 8-stündigen Erhitzen von 10 mg des Kohlenwasserstoffs mit der 15-fachen Menge Selen im geschlossenen Röhrchen auf 360—370° war nach dem Erkalten kein Druck vorhanden und Selenwasserstoff nur in gerade durch den Geruch wahrnehmbaren Spuren entstanden. Bei der Bromierung des Kohlenwasserstoffs in Eisessig trat in der Kälte anscheinend keine Reaktion ein; beim 1-stündigen Erhitzen auf 100—110° zersetzte sich das Reaktionsgemisch unter Schwarzfärbung. Bei der Nitrierung mit einem Gemisch von konz. Salpeter- und Schwefelsäure (3-stündiges Stehen bei Zimmertemperatur, 1-stündiges Erhitzen auf 100°) wurde nach dem Zersetzen mit Eis eine amorphe, höchst unscharf von 80—130° unter Aufschäumen schmelzende, bei 190° sich zersetzende Verbindung erhalten, die nicht zur Krystallisation zu bringen war. Beim Erhitzen mit konz. Salpetersäure auf 110° wird der Kohlenwasserstoff unter Entwicklung nitroser Gase angegriffen; der Abdampfrückstand hat sich jedoch nicht zur Krystallisation bringen lassen. Ebensowenig wurde bei der Oxydation einer Suspension des Kohlenwasserstoffs in Wasser mit Permanganat bei 100° ein krystallisiertes Oxydationsprodukt erhalten.

Synthese von Glycol-α,α'-disebacinsäure und Glycerin-α,β,α'-trisebacinsäure*).

Stoffwechselversuch mit Glycol-α,α'-disebacinsäure und Sebacinsäure;

von *B. Flaschenträger* und *Rosa Allemann***).

[Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Zürich.]

(Eingelaufen am 4. Juni 1942)

Theoretischer Teil.

Nach Genuß von Ulmensamenöl[1]), das etwa 50 Proc. Caprinsäure enthält, traten infolge von ω-Oxydation Dicarbonsäuren im Harn auf. Nach Verkade[2]) sollen auch die üblichen Nahrungsfette und ihre Fettsäuren im normalen Stoffwechsel ω-oxydiert werden. Dabei könnte das endständige Methyl entweder in den freien Fettsäuren oder den Glyceriden zur Carboxylgruppe umgewandelt werden. Die Verbindung müßte dann völlig verbrennen, da man bisher Zwischen- und Endstufen nicht fassen konnte. Lediglich nach Genuß von Triundecylenin wurden 0,04 Proc. Sebacinsäure im Menschenharn gefunden[3]). Die schwerverbrennlichen Dicarbonsäuren mit 8, 9 und 10 Kohlenstoff-Atomen verbrennen als Halbestersäuren besser als die entsprechenden Verbindungen mit zwei freien COOH-Gruppen[4]). Es war daher naheliegend, das Verhalten von Verbindungen zu prüfen, die beim ersten Angriff des noch ungespaltenen Fettes nach Verkade zu erwarten wären.

*) Die vorliegende Arbeit ist meinem verehrten Lehrer, Herrn Geheimrat Prof. Dr. H. Wieland, zum 65. Geburtstag gewidmet.

**) Rosa Allemann, Diss. E. T. H. Zürich (1939).

[1]) P. E. Verkade u. J. van der Lee, H. 225, 230 (1934).

[2]) P. E. Verkade, Fette u. Seifen 46, 521 (1939).

[3]) P. E. Verkade u. J. van der Lee, H. 230, 210 (1934).

[4]) B. Flaschenträger u. K. Bernhard, H. 240, 19 (1936); K. Bernhard, H. 246, 133 (1937).

$$\begin{array}{l} CH_2.O.CO.CH_2\ldots CH_3 \\ CH\ .O.CO.CH_2\ldots CH_3 \\ CH_2.O.CO.CH_2\ldots CH_3 \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} CH_2.O.CO.CH_2\ldots COOH \\ CH\ .O.CO.CH_2\ldots COOH \\ CH_2.O.CO.CH_2\ldots COOH \end{array}$$

Wenn tatsächlich die Esterbindung einige Zeit standhielte, könnte die Stufe der schwer verbrennlichen Dicarbonsäuren im Ablauf einer „Kettenreaktion" durchschritten werden, wie das Verkade[1]) für das Verbrennen der normalen Fettsäuren annimmt. Das Endprodukt wäre dann die Glycerinestersäure der Bernsteinsäure, immer vorausgesetzt, daß die Esterbindung so lange bestehen bleibt. Diese müßte leicht zur gut verbrennlichen Bernsteinsäure gespalten werden.

Die Darstellung von Estersäuren mehrwertiger Alkohole ist bisher kaum versucht worden. Halbestersäuren aus Dicarbonsäuren und einwertigen Alkoholen sind zwar nach Fourneau und Sabetay[2]) leicht zu gewinnen, nicht aber solche von Polyalkoholen, denn dabei treten leicht Glyptalharze[3]) auf. Die freien COOH-Gruppen der Estersäuren reagieren bei höherer Temperatur miteinander und mit freien OH-Gruppen, so daß unverzweigte und verzweigte Molekül-Ketten und Ringe entstehen. Nur ein schonendes Verfahren konnte hier zum Ziel führen.

Um die Verhältnisse zunächst zu vereinfachen, versuchten wir zuerst Glycolestersäuren aufzubauen.

Einwirkung von Sebacinsäuredichlorid in Pyridin auf Glycol, oder von Methylesterchlorid und nachträgliche Abspaltung des Methanols mit salpetriger Säure[4]) führten uns nicht zum Ziel, ebensowenig Oxydation von Undecylaten mit $KMnO_4$, CrO_3. Triazelain[5]) ist durch Oxydation

[1]) P. E. Verkade u. J. van der Lee, R. **54**, 893 (1935) und P. E. Verkade, J. van der Lee u. A. J. S. van Alphen, H. **250**, 47 (1937).

[2]) E. Fourneau u. S. Sabetay, Bull. Soc. chim. (4) **43**, 859 (1928).

[3]) H. Grün in H. Schönfeld, Chemie u. Technol. d. Fette u. Fettprodukte **1**, 297. Wien 1936. — M. Goswami u. A. Shaha, C. **1936**, I. 4712.

[4]) W. Fischer u. A. Schmidt, B. **57**, 693 (1924).

[5]) a) G. Schuster, J. pharm. et chim. (8) **18**, 5 (1931) (C. **1931**, II. 34); A. C. Noorduyn, C. **1920**, I. 731. — b) T. P. Hilditch u. E. F. Armstrong, J. Soc. chem. Ind. Trans. **44**, 43 T (1925).

von Ricinusöl mit $KMnO_4$ in Aceton zu 63,6 Proc. erhalten worden, allerdings ohne eindeutige Belege.

Wir stellten Glycol-α,α'-diundecylat und Glycerin-α,β,α'-triundecylat her und spalteten die Doppelbindung mit Ozon.

$$\begin{array}{l} CH_2.O.CO.(CH_2)_8.CH:CH_2 \\ | \\ CH_2.O.CO.(CH_2)_8.CH:CH_2 \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} CH_2.O.CO.(CH_2)_8.COOH \\ | \\ CH_2.O.CO.(CH_2)_8.COOH \end{array}$$

Die Synthese des Undecylensäureesters gelang gut nach dem etwas modifizierten Verfahren von Verkade[1]). Die unmittelbare Aufspaltung der Doppelbindung mit Permanganat-Chromsäure war unbefriedigend, da in der Kälte und mit organischen Lösungsmitteln gearbeitet werden mußte. Verkochen des Ozonids bewährte sich nicht, dagegen gut seine Reduktion mit Aluminiumamalgam und noch besser die katalytische Hydrierung mit Pd-Mohr nach F. G. Fischer[2]). Die Abtrennung der nicht völlig oxydierten Anteile, die wir mit Hilfe der Äquivalentgewichtsbestimmung messend verfolgten, führte über die Ba-Salze und fraktionierte Fällung aus Lösungsmitteln, wenn auch mit Verlusten, schließlich zu analysenreinen Estersäuren.

Im *Tierversuch* prüften wir das Verhalten der Glycol-α,α'-disebacinsäure und etwas später am gleichen Hund das der Sebacinsäure, indem wir je 40 mg Sebacinsäure als Estersäure und Dicarbonsäure pro Kilogramm und Tag injizierten. Beide Male konnten 11 Proc. unveränderte Sebacinsäure aus dem Harn rein isoliert werden. Damit ist bewiesen, daß sich die zur Hälfte in Esterbindung befindliche Sebacinsäure ebenso wie die freie Säure verhält. Die Esterbindung der Glycolestersäure wird im Gewebe wohl sehr bald gelöst und dürfte als intermediäres Zwischenprodukt beim Abbau ungespaltener Fette in Form von Glycerinestersäure kaum auftreten, auch nicht im Ablauf einer Kettenreaktion.

Verkade findet nach Aufnahme von Triundecylen nur Spuren von Sebacinsäure im Harn. Wir stellen uns vor, daß die Hauptmenge der Undecylensäure in diesem Fall doch

[1]) P. E. Verkade, J. van der Lee u. W. Meerburg, R. **51**, 850 (1932).

[2]) F. G. Fischer, H. Düll u. L. Ertel, B. **65**, 1467 (1932).

β-oxydiert wird, denn intermediär auftretende Sebacinsäure müßte in viel größeren Mengen in den Harn gelangen. Deuterioadipin-, -kork- und -sebacinsäure[1]) zeigen nach Durchlaufen des Tierkörpers keine Änderung im D-Gehalt, der eintreten sollte, wenn noch intermediär beim Fettabbau „leichte" Dicarbonsäuren sich bildeten. Eine ω-Oxydation der normalen Körper- und Nahrungs-Fette ist bisher weder vor, noch nach der Hydrolyse zu Fettsäuren feststellbar. Daher erachten wir die Theorie von der β-Oxydation weiterhin als ausreichend, um das Auftreten von faßbaren Spaltstücken aus dem Fettabbau zu erklären.

Versuchsteil.

Glycol-diundecylat. 10,5 g ($^1/_6$ Mol.) frisch destilliertes Äthylenglycol werden in einem Destillierkolben mit 70 g (etwa $^2/_6$ Mol.) frisch bei 126 bis 129° und 14 mm destillierter Undecylensäure und mit etwa 2 g Zinkstaub vermischt und unter Einleiten von CO_2 bei 150 mm auf 120° erhitzt. Nach $9^1/_2$ Stunden wird bei 120 mm auf 155° erhitzt, bis schließlich 5,5 g Reaktionswasser in die Vorlage abdestillierten (theor. 6,0 g). Nach Abkühlen wird die Masse in 250 ccm Äther gelöst, Zink und 2,6 g Zinkseifen abfiltriert. Der Ätherrückstand lieferte nach wiederholter Fraktionierung im Hochv. bei 200—219° 49,2 g Ester = 75 Proc. d. Th. Er krystallisiert bei Zimmertemperatur, zerfließt bei Handwärme und enthält, gemessen am Laugenverbrauch, noch 0,11 Proc. Undecylensäure.

$C_{21}H_{42}O_4$ (394,3)	Ber.	C 73,03	H 10,73
	Gef.	„ 73,02	„ 10,95.

Glycol-α,α-disebacinsäure. 8,55 g Glycoldiundecylat werden in 100 ccm Essigester gelöst und $8^1/_2$ Stunden bei −18° ozonisiert bis kein Brom mehr aufgenommen wird. Die Lösung wird dann mit 1,2 g Pd-Mohr und 727 ccm Wasserstoff (0°, 760 mm) in $1^1/_4$ Stunden bis zur Sättigung hydriert. Nach Abfiltrieren des Pd und Eindampfen des Essigesters im Vakuum bleiben 8,96 g eines festen, weißen, neutralen Rückstandes. Er wird in 400 ccm Aceton aufgenommen und mit 10,5 g feingepulvertem $KMnO_4$ im Überschuß bei Zimmertemperatur etwa 15 Stunden oxydiert. Dabei fällt Braunstein und das Manganosalz der Glycol-α,α'-disebacinsäure aus. Das Filtrat enthält nur geringe Mengen (1,6 g) einer Substanz mit

[1]) K. Bernhard, Helv. chim. Acta 24, 1412 (1941).

dem Äquiv.-Gew. 1770, die verworfen werden. Der braune Niederschlag wird mit verd. HCl, Na_2SO_3 und Äther gelöst. Nach Waschen und Trocknen hinterläßt der Äther 7,1 g rohe weiße Estersäure mit Äquiv.-Gew. 248 (ber. 215). Daher wird nochmals mit 3,0 g $KMnO_4$ in Aceton oxydiert. In Aceton bleiben 0,92 g mit dem Äquiv.-Gew. 326, Schmelzp. 53—58°; in den Niederschlag gehen 5,7 g rohe Estersäure mit Schmelzp. 72—81° und Äquiv.-Gew. 208. Sie reduziert nicht mehr. — Zur Reinigung wird die rohe Estersäure in 120 ccm Methanol gelöst und mit methanolischer 0,5 n-Barytlauge als Ba-Salz gefällt. Dieses wird mit Aceton ausgekocht, um alle neutralen Anteile (0,2 g) zu entfernen. Nach Zerlegung des Ba-Salzes mit verd. HCl gehen 5,11 g Estersäure vom Schmelzp. 78 bis 85° und Äquiv.-Gew. 208 in den Äther. Die Estersäure enthält noch etwas Sebacinsäure, die durch wiederholte Umfällung aus Aceton mit Petroläther entfernt werden kann. Schließlich bekommt man 2,43 g reine Glycol-α,α'-disebacinsäure mit dem Schmelzp. 87—93°, Äquiv.-Gew. 214 (ber. 215). Ausbeute 25,8 Proc. d. Th.

4,091 mg Subst.: 9,170 mg CO_2, 3,230 mg H_2O.

$C_{22}H_{38}O_8$ (430,4) Ber. C 61,39 H 8,84
Gef. „ 61,13 „ 8,83.

Die Estersäure bildet farblose, feine, federartige, optisch positive Kryställchen. Das reinste Präparat schmolz bei 92—94° (unkorr.). 0,5 g Säure in 2,5 ccm Methanol gelöst und mit 1,5 ccm Wasser gefällt, gaben 0,4 g Krystalle. Die Verbindung ist unlöslich in Wasser, sehr wenig löslich in Petroläther und wenig in Hexan; in kochendem Äther 1 : 31, sehr leicht löslich in Alkohol, Aceton, Essigester, Chloroform, Benzol. Das Na-Salz ist bei 50° in Wasser 1 : 100 löslich, fällt aber in der Kälte wieder aus; das NH_4-Salz ist weniger löslich, unlöslich in Wasser sind das Mg-, Ca-, Ba-, Ag-Salz. In Alkohol sind die Salze etwas besser löslich als in Wasser.

Die Reduktion des Ozonids mit Aluminiumamalgam im Überschuß bis kein Jod mehr aus KJ-Lösung freigesetzt wird und nachträgliche Oxydation mit $KMnO_4$ führt auch zu reiner Estersäure mit etwas geringerer Ausbeute: 12—18 Proc. d. Th.

Glycerin-triundecylat[1]). 9,2 g (0,1 Mol.) frisch destilliertes Glycerin werden mit 60 g (etwa 0,3 Mol.) Undecylensäure und etwas Zinkstaub

[1]) P. E. Verkade, J. van der Lee u. W. Meerburg, R. 51. 850 1932).

wie bei dem Glycolester erhitzt. In 12 Stunden werden bei 150 mm, 155° und später 210° 5 g (ber. 5,4 g) Wasser abgespalten. Der Roh-Ester wird in 300 ccm warmem Äther aufgenommen und von Zinkseifen durch Filtrieren und Ausschütteln mit Säure und sehr verdünnter Soda befreit. Ausbeute 32 g (= 54,3 Proc. d. Th.) eines dunkelgelben Öles mit 0,25 g freier Undecylensäure laut Titration.

4,04 mg Subst.: 10,820 mg CO_2, 3,840 mg H_2O.

$C_{36}H_{62}O_6$ (590,0) Ber. C 73,22 H 10,51 Gef. C 73,03 H 10,64.

Zur Entfärbung wurde mit Äthanol aus Äther gefällt, auch mit Tierkohle und Frankonit aufzuhellen versucht. Am besten bewährte sich jedoch wiederholtes Ausfrieren aus einer Aceton-Äthanol (1 : 4)-Mischung bei der Temperatur von festem CO_2 in Aceton, das schließlich zu einem hellgelben, dickflüssigen Öl führte.

Glycerin-α,β,α'-trisebacinsäure. 8,4 g (0,0142 Mol) Glycerintriundecylat werden in 100 ccm Essigester $10^1/_2$ Stunden bei $-18°$ ozonisiert, bis Brom nicht mehr entfärbt wird; anschließend Hydrierung mit 1,2 g Pd-Mohr und 860 ccm H_2 (0°, 760 mm) in $1^1/_4$ Stunden. Der Pd-freie Rückstand wird mit 10,5 g $KMnO_4$ in 370 ccm Aceton 15 Stunden bei Zimmertemperatur oxydiert. Die acetonische Lösung enthält 2,34 g einer Substanz mit dem Äquiv.-Gew. 541, der Mn-Niederschlag 5,9 g der rohen weichen, gelblichen Ester-Säure mit dem Äquiv.-Gew. 268 (ber. 215). Beide Anteile werden nochmals wie vorher mit 0,8 und 3,5 g $KMnO_4$ oxydiert und liefern dann 5,14 g Estersäure mit dem Äquiv.-Gew. 232, die nun in Methanol als Ba-Salz gefällt und damit von weiteren neutralen Anteilen befreit wird. Aus dem Ba-Salz erhält man jetzt 3,64 g Estersäure mit dem Äquiv.-Gew. 222; sie wird wiederholt in Aceton gelöst und in der Hitze mit Wasser bis zur Trübung versetzt. Nach einigen Tagen scheidet sich die Estersäure als feine krystalline Warzen analysenrein aus. Ausbeute 1,03 g = 11,3 Proc. des eingesetzten Glycerides. Schmelzp. 85—90°.

4,121 mg: 9,261 mg CO_2, 3,270 mg H_2O.

$C_{33}H_{56}O_{12}$ (644)	Ber. C 61,45	H 8,69	Äquiv.-Gew. 215
	Gef. „ 61,23	„ 8,84	„ 220.

Eine weiter gereinigte Probe schmolz bei 88—90°. Die Estersäure ist sehr leicht löslich in Alkohol, Aceton, Essigester, Chloroform, Benzol, weniger gut in Äther, sehr schwer in Hexan u. Petroläther. NH_4-, Na- und Mg-Salz sind löslich in kaltem, besser in warmem Wasser. Das Ca- und Ba-Salz sind ziemlich schwer löslich, Ag-Salz ist unlöslich in Wasser.

Die Reinigung ist verlustreich, da Anteile mit höherem Äquiv.-Gew. die Estersäure hartnäckig begleiten.

Stoffwechselversuch mit Glycol-α,α'-disebacinsäure.

Ein Dackel (10,4 kg) erhielt in 22 Tagen 9,02 g, täglich je 0,43 g der Estersäure als Na-Salz subcutan eingespritzt oder pro Kilogramm und Tag 41,5 mg Estersäure, entsprechend 36 mg Sebacinsäure. Tägliches Futter: 100 g Reis, 50 g mageres Fleisch und Wasser.

Die Substanz wurde jeden Tag in steriler Natronlauge bis zur eben lackmussauren Reaktion gelöst und nur 5 Min. im kochenden Wasserbad sterilisiert. Mehr als 5 Proc. der Estersäure wurden dabei nicht hydrolysiert. Der Harn wurde noch 6 Tage nach der Injektion gesammelt und betrug mit der Nachperiode 15,24 Liter. Nach Ansäuern und Filtrieren über Kieselgur engten wir den Harn auf 1180 ccm schonend ein. Dabei fielen 2 g Kynurensäure aus, die wir mit Alkohol und über das Ba-Salz mit Tierkohle reinigten. Ausbeute: etwa 1 g reine Kynurensäure. Schmelzp. 270°, Mischschmelzp. mit Kynurensäure 270°.

$C_{10}H_7O_3N$ (189) Ber. C 63,47 H 3,73 Gef. C 61,17 H 3,90.

Das Konzentrat schüttelten wir je 9-mal mit 1 Liter Äther 4—6 Stunden auf der Maschine aus. In den Äther gingen 14,9 g einer braunen Schmiere, der wir mit Petroläther ein braunes Öl, 20 mg eines Ester (vielleicht Glycoldisebacinsäure) abtrennten. Die zurückgebliebenen 12 g kochten wir wiederholt mit Wasser aus und konnten durch fraktionierte Krystallisation unter Anwendung von Tierkohle 1,8 g rohe und 0,95 g = 11,1 Proc. analysenreine Sebacinsäure mit dem Schmelzpunkt 129—131° erhalten.

$C_{10}H_{18}O_4$ (202,2) Ber. C 59,40 H 8,91 Gef. C 59,13 H 9,12.

Kontrollversuch mit Sebacinsäure. In einem analogen Versuch injizierten wir demselben Hund 8,55 g Sebacinsäure in 20 Tagen, das sind 40 mg pro Kilogramm und Tag, als Na-Salz. Aus 9,15 Liter Versuchsharn und 4 Liter der 6-tägigen Nachperiode isolierten wir auf analogem Wege wie oben 1,4 g Kynurensäure, 1,8 g rohe und 0,96 g reine Sebacinsäure = 11,3 Proc. der eingesetzten Menge.

Synthesen in der hydroaromatischen Reihe. VII*).

Die Darstellung von partiell hydrierten Derivaten der 7-Methoxy-phenanthren-2-carbonsäure und des 7-Methoxy-2-acetophenanthrens

von *Elisabeth Dane* und *Otto Höss*.

[Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München.]

(Eingelaufen am 4. Juni 1942.)

In der 5. Mitteilung[1]) dieser Reihe haben wir mit Hilfe der Diensynthese ein Isomeres des Östrons dargestellt. Diese Verbindung, die sich vom natürlichen Östron nur durch die sterische Anordnung an den Verknüpfungsstellen der Ringe B, C und C, D unterscheidet, ist physiologisch nicht wirksam. Es erscheint zwar möglich, auf dem Wege der Diensynthese zu anderen Stereoisomeren des Östrons zu kommen, vielleicht auch zu Isomeren, die physiologisch aktiv sind. Aber die Wahrscheinlichkeit, dabei das natürlich vorkommende zu erhalten, ist sehr gering. Wir haben uns daher zunächst einfacheren Problemen zugewandt und haben Derivate des Cyclopentanophenanthrens dargestellt, die dem Östron im Aufbau nahe stehen und die leichter zugänglich sind, in der Hoffnung dabei Stoffe aufzufinden, die im Allen-Doisy-Test aktiv sind. Diese Hoffnung ist nicht unbegründet, da ja bekanntlich eine ganze Reihe von Derivaten des 7-Oxyphenanthrens sich als östrogen erwiesen haben.

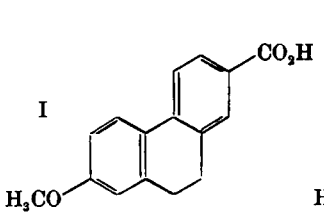
Zunächst wurde versucht Derivate des partiell hydrierten 7-Methoxy-phenanthrens herzustellen, die in 2-Stellung eine Acetogruppe tragen, und die also die Carbonylgruppe, die im Östron in einen Fünfring eingebaut ist, in einer offenen Kette

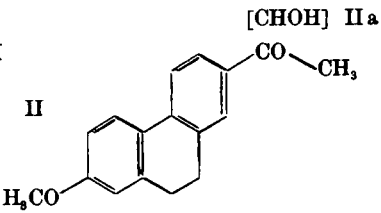
*) Herrn Geheimrat Wieland zum 65. Geburtstag.

[1]) E. Dane u. J. Schmitt, A. 537, 246 (1939).

enthalten. Als Ausgangsmaterial diente die schon früher[1]) beschriebene *7-Methoxy-9,10-dihydrophenanthren-2-carbonsäure* $C_{16}H_{14}O_3$ (I), die durch Addition von Propiolsäureester an 1-Äthinyl-6-methoxy-3,4-dihydro-naphtalin erhalten worden war. Das aus dieser Verbindung I dargestellte Säurechlorid läßt sich auf zwei Wegen in *2-Aceto-7-methoxy-9,10-dihydrophenanthren* $C_{17}H_{16}O_2$ (II)[2]) überführen. Zuerst gelang die Darstellung des Ketons II nach der Methode von Arndt[3]) über das Diazoketon und das Chlorketon. In besserer Ausbeute entstand aber die Verbindung II durch Umsetzung des Säurechlorids mit Zinkdimethyl. Weder das Keton II, noch sein Hydrierungsprodukt IIa, noch das Oxyketon IIb zeigten aber physiologische Wirksamkeit.

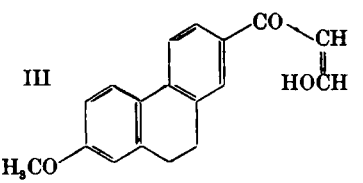
Versuche, das Keton II mit Ameisensäureester zur *Oxymethylenverbindung III* zu kondensieren und in dieser Verbindung einen Ringschluß herbeizuführen sind noch nicht abgeschlossen.





[CHOH] IIa

[HO] IIb



In den Verbindungen II bis IIb ist — abweichend vom Östron — noch ein zweiter Ring aromatisch. Man könnte daran denken, daß diese Abweichung vielleicht den Mangel an

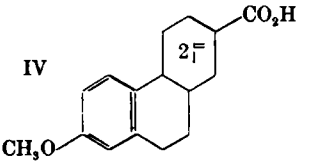
[1]) E. Dane u. O. Höss, A. **536**, 192 (1938).

[2]) E. Mosettig u. A. H. Stuart haben kurz nach uns das Keton II auf einem anderen Weg erhalten. J. Am. Chem. Soc. **61**, 1 (1939).

[3]) F. Arndt u. J. Amende, B. **61**, 1128 (1928).

östrogenen Eigenschaften bedingte. Unser nächstes Ziel war es daher Stoffe vom Typus II herzustellen, in denen dieser Ring C hydriert war. Zunächst wurde die *7-Methoxy-tetrahydrophenanthren-2-carbonsäure* $C_{16}H_{16}O_3$ (IV) als Ausgangsmaterial benutzt, in der Ring C nur partiell hydriert ist. Diese Säure wurde durch Addition von Acrylsäure an 1-Äthinyl-6-methoxy-3,4-dihydro-naphtalin erhalten, eine Diensynthese, bei der eine 1- oder 2-Phenanthren-carbonsäure entstehen kann. Der Konstitutionsbeweis für das Addukt ließ sich durch Dehydrierung mit Chinon erbringen. Diese Dehydrierung kann man in zwei Stufen durchführen. Durch Erhitzen des Adduktes mit Chinon in Anisol erhält man die *7-Methoxy-9,10-dihydrophenanthren-2-carbonsäure* $C_{16}H_{14}O_3$ (I). Erhitzt man aber ohne Lösungsmittel auf 200—220°, so wird auch Ring B aromatisch und man erhält die 7-Methoxy-phenanthren-2-carbonsäure[1]).

IV

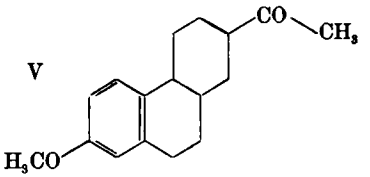


Die Umsetzung des Chlorids der Säure IV verlief komplizierter als im Fall der Säure I. Das normale Diazoketon $C_{17}H_{16}O_2N_2$ wurde nur in mäßiger Ausbeute erhalten. Dagegen entstand ein Diazoketon $C_{18}H_{18}O_2N_4$, das noch ein CH_2N_2 mehr enthält, und das offenbar an eine Doppelbindung Diazomethan angelagert hat. Nur das normale Diazoketon $C_{17}H_{16}O_2N_2$ ergab bei der Spaltung mit Salzsäure das Chlorketon $C_{17}H_{17}O_2Cl$. Beim Versuch aus diesem Derivat des Tetrahydrophenanthrens durch Hydrierung das Halogen zu entfernen, wurde etwa 1 Mol Wasserstoff aufgenommen. Merkwürdigerweise wurde aber nicht ein Derivat des Tetrahydrophenanthrens isoliert, sondern nur das schon bekannte Keton II, $C_{17}H_{16}O_2$, das unter Verlust von 2 Atomen Wasserstoff durch Aromatisierung des Ringes C unter dem Einfluß von Palladium entstanden war. In den Mutterlaugen des Ketons II wurde noch der entsprechende,

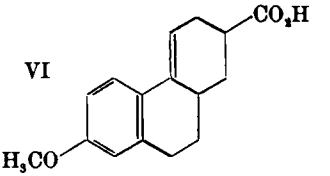
[1]) Anm. 1, S. 114.

um 2 Wasserstoffatome reichere Alkohol $C_{17}H_{18}O_2$ aufgefunden, so daß damit der bei der Hydrierung beobachtete Verbrauch an Wasserstoff teilweise erklärt wird. — Versuche, das Chlorid der Säure IV mit Zinkdimethyl zum Keton aufzubauen, waren bisher nicht erfolgreich.

Dagegen gelang die Synthese eines 7-Methoxy-2-acetophenanthrens, in dem Ring C vollständig hydriert ist. Man ging aus von der Säure IV, die durch Hydrierung in die um 4 Wasserstoffatome reichere *7-Methoxy-octahydro-phenanthren-2-carbonsäure* überführt wurde. Auf dem Wege über das Diazoketon wurde das *7-Methoxy-octahydro-2-acetophenanthren* (V) erhalten, das aber ebenso wie das durch Ätherspaltung erhaltene Phenol Va physiologisch unwirksam war.



V



VI

[HO] Va

Wir haben auch noch durch Addition von 1-Vinyl-6-methoxy-3,4-dihydronaphtalin an Acrylsäure eine *Hexahydromethoxy-phenanthren-carbonsäure* dargestellt. Auch bei dieser Diensynthese erscheint die Carboxylgruppe in der 2-Stellung, wie sich durch Dehydrierung zeigen ließ. Durch Kochen mit Chinon in Anisol wurde unter gleichzeitiger Verlagerung der Doppelbindung allerdings nur der Ring B aromatisiert. Es entstand eine für die Konstitutionsermittlung nicht verwendbare *6-Methoxy-tetrahydro-phenanthren-2-carbonsäure* $C_{16}H_{16}O_3$, in der wahrscheinlich nur Ring B aromatisiert ist. Erst durch Erhitzen mit Palladium auf 250—300° wurde auch der Ring C aromatisch, wobei wiederum die Säure I erhalten wurde. Damit ist die Konstitution des obigen Adduktes im Sinn der Formel VI gesichert, vorausgesetzt, daß keine Wanderung der Doppelbindung eingetreten ist.

Der Firma Schering A.-G. sind wir für die Unterstützung unserer synthetischen Arbeiten zu großem Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche.

Derivate des 9,10-Dihydrophenanthrens.

Darstellung von 2-Aceto-7-methoxy-9,10-dihydrophenanthren (II).

A. Über das Diazoketon.

7-Methoxy-9,10-dihydro-phenanthren-2-carbonsäure-chlorid. 9,5 g 7-Methoxy-9,10-dihydrophenanthren-2-carbonsäure (Schmelzp. 206°) werden mit 11 g PCl_5 2 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Das entstandene $POCl_3$ wird im Vakuum entfernt und der Rückstand im Hochvakuum destilliert. Das Säurechlorid geht als schwach gelb gefärbtes Öl über, das nach einiger Zeit zu einer weißen Krystallmasse erstarrt. Siedep. 208 bis 210°, 0,025 mm. Das Säurechlorid ist in Äther mittelmäßig löslich. Ausbeute 7,5 g. Über eine andere Darstellungsmethode des Säurechlorids, die bessere Ausbeuten liefert, vgl. S. 121.

2-Diazoaceto-7-methoxy-9,10-dihydro-phenanthren. Die Lösung von 5 g Säurechlorid in der nötigen Menge abs. Äther gießt man bei Zimmertemperatur in eine ätherische Diazomethanlösung. Über Nacht scheidet sich das in Äther schwerlösliche Rohprodukt ab. Aus Benzol krystallisiert die Diazoverbindung in gelben Nadeln. Schmelzp. 149° unter Zers. Durch Eindampfen der Ätherlösung erhält man neben etwas Schmieren noch einen kleinen Teil des Diazoketons. Ausbeute 4 g. Die Substanz gibt mit konz. H_2SO_4 eine schöne braunrote Färbung.

2-Chloraceto-7-methoxy-9,10-dihydro-phenanthren. In die ätherische Suspension der Diazoverbindung (4 g) leitet man 4—5 Stunden getrockneten Chlorwasserstoff ein, wobei eine starke Stickstoffentwicklung einsetzt. Allmählich scheidet sich das in Äther schwer lösliche Chlorketon in langen Nadeln ab. Rohausbeute 3,2 g. Aus Methanol erhält man farblose verfilzte Nadeln, die sich nach längerem Stehen an der Luft schwach braun färben. Schmelzp. 117°.

2-Aceto-7-methoxy-9,10-dihydro-phenanthren. 600 mg des Chlorketons werden in der nötigen Menge Methanol gelöst.

Diese Lösung wird mit 1 g Palladium-Bariumsulfat (nach Paal) unter Zusatz von Calciumcarbonat so lange mit Wasserstoff geschüttelt, bis die für 1 Mol berechnete Wasserstoffmenge aufgenommen ist. Dies ist in einigen Minuten der Fall. Beim Einengen der methylalkoholischen Lösung scheidet sich das Keton in farblosen Nadeln ab. Ausbeute 350 mg. Die Substanz wird aus heißem Methanol umkrystallisiert. Die alkoholische Lösung fluoresciert schwach. Schmelzp. 133°. Mit Dinitro-phenylhydrazin erhält man sofort ein rotes Hydrazon.

3,432 mg Subst. (bei 56° i. Hochv. getr.): 10,179 mg CO_2, 1,979 mg H_2O.

$C_{17}H_{16}O_2$ (252) Ber. C 80,95 H 6,35 Gef. C 80,89 H 6,45.

2-Aceto-7-oxy-9,10-dihydro-phenanthren. Die Methoxylspaltung des Ketons (Schmelzp. 133°) wird mit Bromwasserstoffsäure (d = 1,48) in Eisessig durchgeführt. Die Mischung wird 1 Stunde lang zum Sieden erhitzt. Dann wird wie üblich aufgearbeitet. Aus 80 mg Ausgangsmaterial erhält man 35 mg Oxyketon. Die Substanz schmilzt nach öfterem Umkrystallisieren aus wäßrigem Methanol oder Benzol bei 188—189°. Sie krystallisiert in unregelmäßigen Platten.

3,427 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. getr.): 10,190 mg CO_2, 1,810 mg H_2O.

$C_{16}H_{14}O_2$ (238) Ber. C 80,67 H 5,88 Gef. C 81,09 H 5,91.

2-Oxyäthyl-7-methoxy-9,10-dihydrophenanthren. Läßt man die oben beschriebene Hydrierung 2 Stunden lang gehen, so wird die für 2 Mol berechnete Wasserstoffmenge aufgenommen. Aus 350 mg Chlorketon erhält man 220 mg Alkohol. Aus Cyclohexan oder wäßrigem Methanol farblose Tafeln vom Schmelzp. 116—117°. Der Alkohol ist in Äther und kaltem Methanol im Gegensatz zum Keton sehr leicht löslich. Er gibt mit Dinitro-phenyl-hydrazin keine Reaktion. Analyse vgl. S. 122.

B. Durch Umsetzung des Säurechlorids mit Zinkdimethyl.

Das Säurechlorid aus 6 g 7-Methoxy-9,10-dihydro-phenanthren-2-carbonsäure wird in 150 ccm abs. Toluol gelöst und in einer Kohlendioxyd-Atmosphäre mit einer Lösung von 5 g

Zinkdimethyl in 40 ccm abs. Toluol tropfenweise bei Zimmertemperatur versetzt. Die Mischung bleibt über Nacht stehen. Dann wird mit Alkohol in einer Kohlendioxyd-Atmosphäre das überschüssige Zinkdimethyl zerstört. Die Toluollösung wird mit verd. Schwefelsäure versetzt, um das gebildete Zinkhydroxyd zu lösen. Nicht umgesetzte Säure wird durch mehrmaliges Schütteln der Toluollösung mit verd. Kalilauge entfernt. Nach dem Verdampfen der gewaschenen und getrockneten Toluollösung im Vakuum erhält man das Keton in einer Ausbeute von 4,5 g. Der Schmelzpunkt dieses Rohproduktes liegt bei 132—134°. Es ist nur durch geringe Mengen von Säure verunreinigt. Diese kann sehr leicht durch Adsorption an Aluminiumoxyd am besten aus benzolischer Lösung abgetrennt werden. Mit Dinitro-phenylhydrazin gibt die Substanz sofort ein rotes Hydrazon. Aus Methanol erhält man farblose Nadeln oder Stäbchen vom Schmelzp. 133—134°, die im Mischschmelzpunkt mit dem oben erhaltenen Keton keine Depression zeigen.

Umsetzung von 2-Aceto-7-methoxy-9,10-dihydro-phenanthren mit Ameisensäure-ester. Zu der Suspension von Natrium-äthylat (aus 0,5 g Natrium und der nötigen Menge Äthanol) in abs. Äther fügt man die Lösung von 2,8 g Keton in 50 ccm abs. Dioxan hinzu. Darauf läßt man die Lösung von 2,8 g Ameisensäure-ester in 10 ccm abs. Äther bei Zimmertemperatur zutropfen. Die Mischung bleibt über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Dann hat sich die in Äther und Dioxan völlig unlösliche Natriumverbindung der entstandenen Oxymethylenverbindung (III) fast quantitativ abgeschieden. Ausbeute 3,5 g. Das Natriumsalz ist weiß, färbt sich aber mit der Zeit schwach gelb.

1 g der Natriumverbindung wird unter Zugabe von etwas Natriumcarbonatlösung in der nötigen Menge Wasser gelöst. Die trübe Lösung wird durch mehrmaliges Schütteln mit Äther von neutralen Bestandteilen befreit. Dann wird die klare wäßrige Lösung mit verd. Schwefelsäure neutralisiert. Die dabei ausfallende gelbe Oxymethylenverbindung (III) wird in Äther aufgenommen. Die Ätherlösung wird eingeengt und mit Petroläther bis zur Trübung versetzt. Über Nacht haben sich 0,8 g Krystalle abgeschieden. Aus Benzol und Petroläther orangegelbe Prismen vom Schmelzp. 136—137°. Die Substanz gibt mit Eisenchlorid in alkoholischer Lösung eine intensive olivbraune Enolreaktion. Sie ist außer in Alkohol und Petroläther in den meisten Lösungsmitteln sehr leicht löslich.

$C_{18}H_{16}O_3$ (280) Ber. C 77,14 H 5,72 Gef. C 77,43 H 6,00.

Derivate des Tetrahydro-phenanthrens.

7-Methoxy-tetrahydro-phenanthren-2-carbonsäure.

Man bringt 20 g 1-Äthinyl-6-methoxy-3,4-dihydro-naphtalin unter Eiskühlung in etwa 100 ccm Bromwasserstoff-Äther-Lösung und fügt 40 g Acrylsäure hinzu. Das Arbeiten mit dem doppelten Überschuß an Acrylsäure ist notwendig, da sonst die Ausbeute an Addukt sehr gering ist. Nach 2-tägigem Stehen der Mischung scheidet sich das Additionsprodukt in gelben Nadeln in einer Ausbeute von 16 g ab. Nach 5- bis 6-tägigem Stehen der Mutterlauge erhält man noch etwa 3 g an Addukt. Die als Rohprodukt anfallende Säure ist schon ziemlich rein. Sie läßt sich aus Benzol oder Alkohol umkrystallisieren. Der Schmelzpunkt ist auch nach öfterem Umkrystallisieren unscharf. Die Substanz schmilzt zwischen 210 und 216° unter schwacher Zersetzung, die bei steigender Temperatur stärker wird (Decarboxylierung).

Der mit Diazomethan dargestellte *Ester* krystallisiert in hellgelben Nadeln vom Schmelzp. 92°.

3,722 mg Subst. (bei 60° i. V. getr.): 10, 310 mg CO_2, 2,230 mg H_2O.
$C_{17}H_{18}O_3$ (270) Ber. C 75,56 H 6,67 Gef. C 75,55 H 6,70.

Dehydrierung von 7-Methoxy-tetrahydro-phenanthren-2-carbonsäure-methylester.

1. *In Anisol bei 152°.* 250 mg Ester Schmelzp. 92° werden mit der 4-fachen Menge Chinon in 5 ccm Anisol 2 Stunden lang auf 152° erhitzt. Beim Erkalten der Anisollösung hat sich das Chinhydron zum größten Teil abgeschieden. Nach dem Filtrieren wird das Anisol i. V. entfernt und der Rückstand in Äther aufgenommen. Nach Adsorption an Aluminiumoxyd und nach dem Entfernen des überschüssigen Chinons erhält man aus Methanol lange farblose Stäbchen vom Schmelzp. 85°. Diese geben mit dem Ester der 7-Methoxy-dihydro-phenanthren-2-carbonsäure, den man durch Addition von Propargylester an den Äthinkörper erhält, im Mischschmelzpunkt keine Depression.

2. *Ohne Lösungsmittel bei 200—220°.* 250 mg Ester vom Schmelzp. 92° werden mit der 4-fachen Menge Chinon auf 200 bis

220° 2 Stunden lang erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgt in der vorher geschilderten Weise. Aus Methanol farblose Stäbchen vom Schmelzp. 134°, die mit 7-Methoxy-phenanthren-2-carbonsäure-methylester im Mischschmelzpunkt keine Depression geben.

Versuche zur Darstellung von 2-Aceto-7-methoxy-tetrahydro-phenanthren.

A. Über das Diazoketon.

7-Methoxy-tetrahydro-phenanthren-2-carbonsäure-chlorid. 3,9 g Säure werden in der nötigen Menge abs. Toluols gelöst. Die erkaltete Lösung wird dann mit einer Lösung von 1,8 ccm Thionylchlorid und 1,7 ccm trocknem Pyridin in etwa 10 ccm abs. Toluol versetzt. Dabei erwärmt sich die Mischung beträchtlich und salzsaures Pyridin scheidet sich sofort krystallin oder ölig ab. Nach einigem Stehen bei Zimmertemperatur wird überschüssiges Pyridin durch einige Tropfen ätherischer Salzsäure ausgefällt. Dann wird filtriert und das Toluol i. V. abgedampft. Das Säurechlorid bleibt als gelbes Öl zurück. Mit dem Toluol sind bei der Vacuumdestillation geringe Mengen von Säurechlorid flüchtig.

2-Diazoaceto-7-methoxy-tetrahydro-phenanthren. Das rohe Säurechlorid wird mit einer ätherischen Diazomethanlösung versetzt. Über Nacht scheidet sich das in Äther schwer lösliche Rohprodukt ab. Dieses stellt ein Gemisch dar von zwei verschiedenen Diazoketonen. Ausbeute an Rohprodukt 3,3 g. Das Gemisch ist auf keine Weise zu trennen. Eine Untersuchung der 2 Diazoketone gelang auf folgende Weise: Einige Stunden nach Zugabe der Diazomethanlösung scheidet sich zuerst ein intensiv gelbes Diazoketon in geringer Ausbeute ab, das sehr einheitlich ist. Aus Benzol-Petroläther gelbe Nadeln vom Schmelzp. 148° unter Zersetzung. Die Substanz gibt mit konz. Schwefelsäure eine karminrote Färbung.

4,290 mg Subst. (bei 34° i. Hochv. getr.): 11,412 mg CO_2, 2,210 mg H_2O.

$C_{17}H_{16}O_2N_2$ (280) Ber. C 72,85 H 5,71 Gef. C 72,64 H 5,77.

Dieses Diazoketon gibt mit dem Diazoketon, dessen Ring C aromatisch ist (S. 117) Schmelzpunktdepression, ist also nicht mit diesem identisch.

Aus den letzten ätherischen Mutterlaugen scheidet sich beim Einengen der Ätherlösung in geringer Menge ein zweites Diazoketon ab. Aus Benzol und Petroläther schwach hellgelb gefärbte Nadeln vom Schmelzpunkt 159° unter Zers. Die Substanz gibt mit konz. Schwefelsäure eine braunrote Färbung.

3,957 mg Subst. (34° i. Hochv. getr.): 9,720 mg CO_2, 2,150 mg H_2O. — 2,780 mg Subst. (34° i. Hochv. getr.): 0,429 ccm N_2 (20°, 725 mm).

$C_{17}H_{16}O_2N_2 + CH_2N_2$ (322)	Ber.	C 67,08	H 5,60	N 17,39
	Gef.	„ 66,99	„ 6,08	„ 17,15.

Die allerdings für Wasserstoff nicht gut stimmende Analyse zeigt, daß sich an eine Doppelbindung Diazomethan angelagert haben muß. Die zwei isolierten Diazoketone zeigen im Mischschmelzpunkt starke Depression.

2-Chloraceto-7-methoxy-tetrahydro-phenanthren. Aus dem Diazoketon wird das Chlorketon durch Spaltung mit Chlorwasserstoffgas in ätherischer Lösung erhalten. Dabei zeigt es sich, daß sich nur das Diazoketon vom Schmelzp. 148° mit HCl-Gas spalten läßt. Das Diazoketon vom Schmelzpunkt 159° dagegen entwickelt unter dem Einfluß von HCl-Gas wohl stürmisch Stickstoff, verharzt aber dann unter starker Dunkelfärbung vollkommen. Die entstehenden Schmieren sind in allen Lösungsmitteln unlöslich. Deshalb erhält man aus dem Gemisch der beiden Diazoketone (3,3 g) bei der Spaltung nur etwa 1 g Chlorketon, das dem Diazoketon vom Schmelzp. 148° entspricht. Aus Methanol krystallisiert das 2-Chloraceto-7-methoxy-tetrahydrophenanthren in schwach gelb gefärbten Nadeln oder Stäbchen vom Schmelzp. 132°. Im Mischschmelzpunkt mit der Verbindung $C_{17}H_{15}O_2Cl$, deren Ring aromatisch ist, starke Depression.

Die katalytische Hydrierung von 2-Chloraceto-7-methoxy-tetrahydrophenanthren. 0,35 g Chlorketon vom Schmelzp. 132° werden in der nötigen Menge Methanol gelöst. Diese Lösung wird mit 0,8 g Palladium-Bariumsulfat unter Zusatz von reinem Calciumcarbonat so lange mit Wasserstoff geschüttelt, bis die für ein Mol berechnete Wasserstoffmenge aufgenommen ist. Dies ist in etwa 15 Minuten der Fall. Aufgenommene Wasserstoffmenge 35 ccm; ber. 31 ccm. Beim Einengen der alkoholischen Lösung scheidet sich das Keton in farblosen Nadeln vom Schmelzp. 133° ab. Ausbeute 130 mg. Die alkoholische Lösung fluoresciert schwach. Mit Dinitrophenylhydrazin gibt die Substanz ein rotes Hydrazon. Das erhaltene Keton gibt mit dem Keton $C_{17}H_{16}O_2$, dessen Ring C aromatisch ist, im Mischschmelzpunkt keine Depression.

3,937 mg Subst. (bei 56° i. Hochv. getr.): 11,663 mg CO_2, 250 mg H_2O.

$C_{17}H_{16}O_2$ (252) Ber. C 80,95 H 6,35 Gef. C 80,79 H 6,39.

Beim weiteren Einengen der oben erhaltenen Mutterlauge erhält man eine Krystallisation von etwa 50 mg. Diese stellt ein Gemisch dar vom unscharfen Schmelzp. 122°. Die Mutterlauge dieser Fraktion wird mit Wasser bis zur Trübung versetzt. Über Nacht krystallisiert eine neue Verbindung in farblosen Tafeln in einer Ausbeute von 100 mg. Nach öfterem Umkrystallisieren aus wäßrigem Methanol liegt der Schmelzpunkt bei 116—117°. Diese Verbindung gibt mit dem Keton vom Schmelzp. 133° eine Schmelzpunktdepression. Die Verbindung vom

Schmelzp. 116° gibt mit Dinitro-phenylhydrazin kein Hydrazon. Auf Grund der Analyse muß der Alkohol entstanden sein.

3,892 mg Subst. (bei 56° i. Hochv. getr.): 11,485 mg CO_2, 2,537 mg H_2O.

$C_{17}H_{18}O_2$ (254) Ber. C 80,31 H 7,09 Gef. C 80,48 H 7,29.

Auf diesem Wege konnte also das Keton, das im Ring C 2 Doppelbindungen besitzt, nicht gewonnen werden. Es war bei der Abspaltung von Chlor nach Rosenmund unter dem Einfluß von Palladium im Ring C eine Dehydrierung und teilweise eine Hydrierung zum Alkohol erfolgt.

B. Durch Umsetzung des Säurechlorids mit Zinkdimethyl.

Das Säurechlorid (gebildet aus 1,5 g Säure vom Schmelzp. 210 bis 216°) wird in etwa 40 ccm abs. Toluol gelöst und in einer Kohlendioxydatmosphäre mit einer Lösung von 0,9 g Zinkdimethyl in 20 ccm abs. Toluol bei Zimmertemperatur versetzt. Dabei erwärmt sich die Mischung leicht und färbt sich intensiv rotgrün. Die Mischung bleibt über Nacht stehen. Dann wird, wie auf S. 119 beschrieben, aufgearbeitet. Nach dem Verdampfen des Toluols hinterbleiben nicht krystallisierende gelbe Schmieren. Diese geben mit Dinitrophenylhydrazin eine sehr schwache rote Ketonreaktion. Mit Semicarbazid-acetat konnten 350 mg Semicarbazon isoliert werden. Die Spaltung dieses Semicarbazons mit gleichzeitiger Methoxylspaltung wird mit Bromwasserstoffsäure in Eisessig durchgeführt. Man erhielt wohl einen kleinen Anteil, der in Lauge löslich war, aber eine krystallisierende Verbindung konnte nicht erhalten werden.

Die Umsetzung des Säurechlorids mit Zinkdimethyl wurde noch einmal in der Kälte bei – 10° durchgeführt. Wiederum färbte sich die Mischung intensiv rotgrün. Die Aufarbeitung ergab die gleichen gelben nicht krystallisierenden Schmieren wie vorhin. Diese gaben aber mit Dinitrophenylhydrazin eine intensive dunkelbraunrote Ketonreaktion. Die Methoxylspaltung dieser Schmieren ergab keine krystallisierende Verbindung.

Derivate des Octahydro-phenanthrens.

2-Aceto-7-oxy-octahydro-phenanthren.

7-Methoxy-octahydro-phenanthren-2-carbonsäure. 4 g der Säure vom Schmelzp. 210—216° werden in 150 ccm Anisol mit Palladium-Tierkohle hydriert. Im Laufe von 4 Tagen wird knapp die für 2 Mol berechnete Wasserstoffmenge aufgenommen. Dabei wird die anfangs gelbe Lösung farblos. Nach dem Entfernen des Anisols i. V. bleibt die Säure farblos zurück. Aus Benzol-Petroläther nicht einheitliche farblose Krystalle (in der Hauptsache Nadeln). Der Schmelzpunkt wird auch nach öfterem Umkrystallisieren nicht scharf und konstant.

2-Chloraceto-7-methoxy-octahydro-phenanthren. Das bei der Hydrierung anfallende Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung für die Darstellung des Ketons verwendet. Der Gang ist der gleiche, wie schon geschildert. Die Säure wird in das Säurechlorid, dieses in das Diazoketon mit Diazomethan übergeführt. Auf eine Isolierung des Diazoketons wird verzichtet. Das Diazoketon wird in Ätherlösung gleich mit HCl-Gas gespalten. Das entstandene Chlorketon wird zur Reinigung in Benzol aufgenommen und an Aluminiumoxyd adsorbiert. Aus Benzol–Petroläther oder Methanol farblose Prismen vom Schmelzp. 99°. Ausbeute 2,8 g.

4,065 mg Subst. (bei 56° i. Hochv. getr.): 10,416 mg CO_2, 2,624 mg H_2O.

$C_{17}H_{21}O_2Cl$ (292,5) Ber. C 69,74 H 7,18 Gef. C 69,88 H 7,22.

7-Oxy-2-aceto-octahydro-phenanthren. 600 mg Chlorketon Schmelzpunkt 99° werden mit 1,2 g Palladium–Bariumsulfat bei Gegenwart von Calciumcarbonat in alkoholischer Lösung so lange mit Wasserstoff geschüttelt, bis 1 Mol Wasserstoff aufgenommen ist (50 ccm). Nach dem Verdampfen des Alkohols erhält man das halogenfreie Keton, das nicht zum Krystallisieren zu bringen ist. Es gibt mit Dinitrophenylhydrazin ein gelbes Hydrazon. Das nicht krystallisierende Keton wird dann der Methoxylspaltung unterworfen.

Das Keton wird in 5 ccm Eisessig gelöst, mit 5 ccm Bromwasserstoffsäure (d 1,48) versetzt und 2 Stunden lang zum Sieden erhitzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels i. V. wird der Rückstand in verd. Lauge aufgenommen. Beim Ansäuern fällt das Oxyketon krystallin aus. Aus Äther–Petroläther farblose Prismen. Ausbeute 200 mg. Mit Dinitrophenylhydrazin gibt die Substanz nach längerem Stehen ein gelbes Hydrazon. Aus wäßrigem Methanol krystallisiert sie in farblosen Nadeln vom Schmelzp. 158—159°.

3,875 mg Subst. (getr. bei 80° i. V.): 11,175 mg CO_2, 2,848 mg H_2O.

$C_{16}H_{20}O_2$ (244) Ber. C 78,68 H 8,19 Gef. C 78,65 H 8,22.

Derivate des Hexahydro-phenanthrens.

7-Methoxy-hexahydro-phenanthren-2-carbonsäure.

3 g 1-Äthinyl-6-methoxy-3,4-dihydro-naphtalin werden in 20 ccm stabilem Cyclohexan bei Gegenwart von Palladium-Calciumcarbonat mit Wasserstoff geschüttelt, bis die für 1 Mol berechnete Wasserstoffmenge aufgenommen ist. Nach dem Filtrieren wird die Lösung mit 3 g Acrylsäure versetzt und etwa 14 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Über Nacht krystallisiert das Rohprodukt in einer Ausbeute von 1,2 g.

Aus Methanol schwach gelb gefärbte Prismen vom Schmelzpunkt 185°.

3,85 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. getr.): 10,477 mg CO_2, 2,496 mg H_2O.

$C_{16}H_{10}O_3$ (258) Ber. C 74,41 H 6,97 Gef. C 74,22 H 7,25.

Die Dehydrierung der 7-Methoxy-hexahydro-phenanthren-2-carbonsäure. Der Konstitutionsbeweis sollte durch *Selen-Dehydrierung* zum 1- oder 2-Methyl-7-methoxy-phenanthren erbracht werden.

0,4 g Säure werden mit 0,6 g Selen 10 Stunden auf 300—320° erhitzt. Bei der Aufarbeitung dieses Versuches wurde nur ein Dehydrierungsprodukt vom Schmelzp. 99° isoliert, das wahrscheinlich identisch ist mit dem 7- (bzw. das 2-) Methoxy-phenanthren vom Schmelzp. 99°. Es gibt Schmelzpunktdepression mit dem bei 143—144° schmelzenden 2-Methyl-7-methoxy-phenanthren. Offenbar hat die Säure bei der Selendehydrierung unter dem Einfluß zunächst einer Doppelbindung CO_2 abgespalten.

Es wurde daher der Ester der *Dehydrierung mit Chinon* unterworfen. Der mit Diazomethan dargestellte *7-Methoxy-hexahydro-phenanthren-carbonsäure-methylester* ist nicht krystallisiert zu erhalten. Die Dehydrierung erfolgte zunächst in Anisol in der gleichen Weise, wie auf S. 120 geschildert ist. Aus etwa 450 mg Ausgangsmaterial erhält man 250 mg Rohprodukt, das schon ziemlich rein ist. Durch Aufarbeiten der Mutterlauge kann die Ausbeute verbessert werden. Aus Methanol erhält man als Dehydrierungsprodukt den Methylester einer *Tetrahydro-methoxy-phenanthren-carbonsäure* in weißen langen verfilzten Nadeln vom Schmelzpunkt 107°.

4,416 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. getr.): 12,265 mg CO_2, 2,645 mg H_2O.

$C_{17}H_{16}O_3$ (270) Ber. C 75,56 H 6,67 Gef. C 75,75 H 6,70.

Die weitere Dehydrierung wurde mit *Palladium* durchgeführt. 100 mg Ester vom Schmelzp. 107°, der durch Chinondehydrierung des Methoxy-hexahydro-phenanthren-carbonsäure-methylesters erhalten worden war, werden mit 100 mg Palladium 30 Minuten auf 250—260° erhitzt. Darauf wird die Temperatur langsam auf 300° gesteigert und das Dehydrierungsprodukt bei 12 mm abdestilliert. Ausbeute etwa 70 mg. Das Rohprodukt wird in Methanol aufgenommen. Als erste Krystallisation erhält man den *7-Methoxy-phenanthren-2-carbonsäure-methylester* in einer Ausbeute von 30 mg. Nach 2-maligem Umkrystallisieren liegt der Schmelzpunkt bei 133—134°. Der Ester gibt im Mischschmelzpunkt mit der schon bekannten Verbindung keine Depression.

Der Ester vom Schmelzp. 107° läßt sich auch durch leichtes Schmelzen mit Chinon dehydrieren.

Die Konstitution des Dehydro-di-isoeugenols und seine Bedeutung für die Chemie des Lignins*);

von *Karl Freudenberg* und *Hermann Richtzenhain.*

[Aus dem Institut für die Chemie des Holzes und der Polysaccharide, Chemisches Institut der Universität Heidelberg.]

(Eingelaufen am 4. Juni 1942.)

H. Cousin und H. Hérissey[1]) haben gefunden, daß 2 Moleküle Isoeugenol durch den Glycerinauszug des Pilzes Russula delica und Luft oder durch Eisen III-chlorid in alkoholischer Lösung zu einem dimeren Produkte dehydriert werden. Sie schrieben ihm die Konstitution eines Diphenylderivates zu. H. Erdtman[2]) hat jedoch bewiesen, daß ein Cumaranderivat vorliegt, für das er eine der Formeln I oder II aufstellte.

H. Erdtman gab aus verschiedenen Gründen der Formel I den Vorzug und stützte diese Auffassung neuerdings durch den Befund[3]), daß bei der katalytischen Hydrierung (nach Sättigung der Doppelbindung) der Cumaranring aufgespalten wird. Diese Reaktion ist wahrscheinlicher bei einem 2- als bei einem 3-Phenyl-cumaran.

Der strenge Beweis für die im folgenden als zutreffend erkannte Formel I fehlte jedoch bisher. Er war um so wichtiger, als das Dehydro-di-isoeugenol (I) und seine Umwandlungsprodukte eine wertvolle Modellsubstanz für das Lignin geworden sind, mit dem sie in einer Anzahl der maßgebenden

*) 52. Mitt. über Lignin von K. Freudenberg u. Mitarbeitern. — Herrn Geheimrat H. Wieland zum 65. Geburtstag gewidmet.

[1]) C. r. **147**, 247 (1908); J. Pharm. Chim. (6) **28**, 193 (1908); Bl. (4) **3**, 1070 (1908).

[2]) Bio. Z. **258**, 172 (1933); A. **508**, 283 (1933).

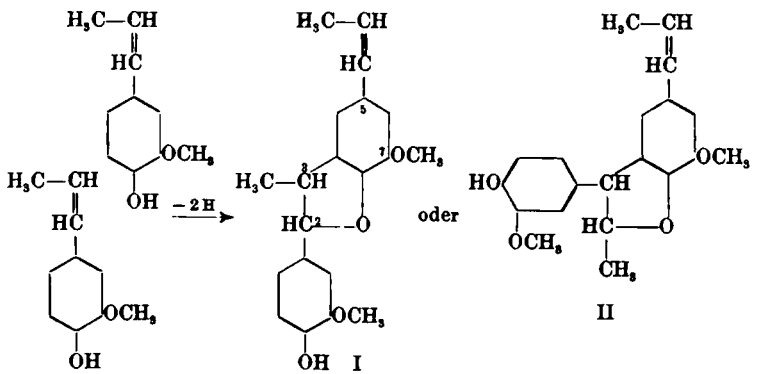
[3]) Svensk Papperstidn. **44**, 243 (1941).

Reaktionen übereinstimmen. Ein Teil der Ligninreaktionen kann am besten mit dem Formelausschnitt III erklärt werden, der diesen Modellen nahesteht. Vor allem hat die Säure IV, die wir bisher Erdtmansche Säure genannt haben und die jetzt als 2-(3,4-Dimethoxy-phenyl-),3-methyl-7-methoxy-cumaran-carbonsäure-(5) bezeichnet werden kann, eine wichtige Rolle für die Chemie des Lignins gespielt.

Der Ausgangspunkt für die vorliegende Untersuchung war die Beobachtung, daß der Cumaranring in der Verbindung V durch metallisches Kalium in Ammoniak aufgespalten wird[1]) und daß am Lignin entsprechende Umwandlungen eintreten. Aus V entsteht dabei ein Phenol, für das die Formel VI angenommen wurde unter der Voraussetzung, daß für das Dehydro-di-isoeugenol die Formel I zutrifft.

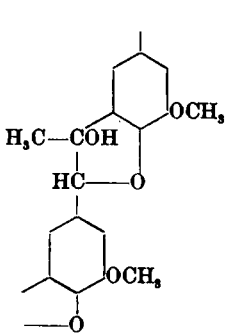
Aus VI haben wir durch Entmethylierung ein Di-phenylpropanderivat erhalten, das α-(3,4-Dioxyphenyl)-β-(2,3-dioxy-5-propyl-phenyl)-propan VII sein mußte, wenn für das Dehydro-di-isoeugenol die Formel I zutrifft. Im anderen Falle (II) hätte das Umwandlungsprodukt ein α,α-Di-phenyl-propanderivat sein müssen.

Zur Entscheidung wurde das Phenol VII synthetisiert.

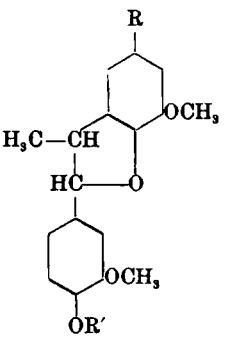


2 × Isoeugenol. I II Dehydro-di-isoeugenol.

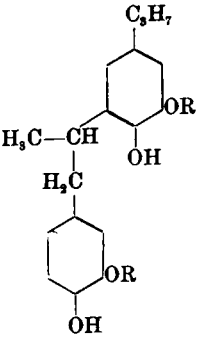
[1]) K. Freudenberg, W. Lautsch u. G. Piazolo, B. 74, 1888 (1941).



III

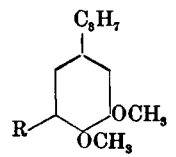


IV R = COOH, R′ = CH_3
V R = CH_2–CH_2–CH_3, R′ = CH_3

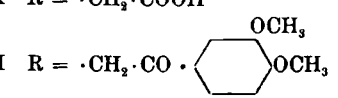


VI R = CH_3
VII R = H

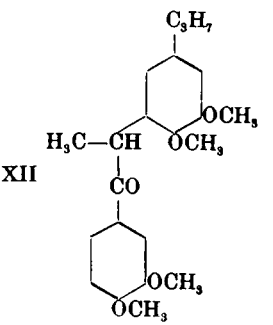
Die Synthese geht vom o-Vanillin aus, das in p-Allyl-o-vanillin (2-Oxy-3-methoxy-5-allyl-benzaldehyd) und dessen Hydrierungs- und Methylierungsprodukt, den 2,3-Dimethoxy-5-propyl-benzaldehyd VIII, verwandelt wird. Daraus wurde über das Azlacton die Brenztraubensäure IX und aus dieser, entsprechend einer Methode von C. Schöpf, H. Perrey und J. Jäckh[1]) die 2,3-Dimethoxy-5-propyl-phenylessigsäure X hergestellt. Das Chlorid dieser Säure wurde mit Veratrol zum Keton XI kondensiert. In diesem läßt sich mit Natriummethylat und Methyljodid ein Wasserstoffatom der Methylengruppe durch Methyl ersetzen. Die Reduktion des so gebildeten Ketons XII gelingt nur bei wiederholter Behandlung nach Clemmensen in mäßiger Ausbeute. Dabei entsteht das



VIII R = ·COH
IX R = ·CH_2·CO·COOH
X R = ·CH_2·COOH



XI R = ·CH_2·CO·



XII

[1]) A. **497**, 55 (1932).

Methylierungsprodukt von VI, das aber nicht als solches, sondern nach der Entmethylierung mit dem Phenol VII identifiziert wurde.

Damit ist für das Dehydro-di-isoeugenol die Konstitution I bewiesen. Durch diese Feststellung gewinnt auch seine eingangs geschilderte Entstehung durch Dehydrierung des Isoeugenols eine erhöhte Bedeutung für die Entstehung des Lignins.

Es ist möglich, daß ein Teil der Lignineinheiten durch Dehydrierung von Coniferylalkohol oder ähnlichen Bausteinen der gleichen Oxydationsstufe entsteht, wobei Benzofuran-Systeme zu erwarten sind, die sich vom Dehydro-di-isoeugenol durch einen Mehrgehalt an Sauerstoff unterscheiden. Ein früher von Herrn E. Flickinger ausgeführter Versuch[1]), den Coniferylalkohol mit Eisen(III)-chlorid zu dehydrieren, hat ein amorphes Kondensat ergeben, aus dem sich nach der Methylierung, Behandlung mit heißem Alkali, erneuter Methylierung und Oxydation neben Veratrumsäure Spuren von Isohemipinsäure (etwa 1 Proc.) gewinnen ließen. Aus dem Lignin und aus der Cumarancarbonsäure IV entstehen diese Säuren unter den gleichen Bedingungen. Aus diesem Versuch geht hervor, daß die Dehydrierung des Coniferylalkohols wenigstens teilweise ähnlich wie die des Isoeugenols verläuft.

Durch Säure (ohne Oxydation) hergestellter amorpher polymerer Coniferylalkohol liefert bei der gleichen Behandlung nur Veratrumsäure, aber keine Spur einer Dicarbonsäure. Der polymere Coniferylalkohol reagiert zwar mit Bisulfit und Thioglycolsäure, die Produkte sind aber von den entsprechenden des Lignins verschieden und lassen sich nicht zur Isohemipinsäure oder einer anderen Dicarbonsäure abbauen. Die Polymerisation des Coniferylalkohols scheint sich vorwiegend in der Seitenkette abzuspielen. Das paraständige Phenolhydroxyl bleibt dabei unberührt.

Beschreibung der Versuche.

α-(3,4-Dioxyphenyl)-β-(2,3-dioxy-5-propyl-phenyl)-propan (VII) aus Dehydro-di-isoeugenol I.

Das aus V durch Aufspaltung mit Kalium in flüssigem Ammoniak erhaltene Produkt[2]) wird in 20-proc. Natronlauge

[1]) Dissertation von E. Flickinger, Heidelberg 1937, vgl. K. Freudenberg, Fortschr. d. Chem. organ. Naturstoffe. II. Band. 1939. S. 21.

[2]) Vgl. Anm. 1, S. 127.

gelöst und bei 50—60° mit Dimethylsulfat methyliert, wobei sich das Methylprodukt ölig ausscheidet. Man äthert aus, destilliert nach Abdampfen des Äthers i. V. und erhält ein schwach gelbliches Öl vom Siedep.$_{0,01}$ 145—150°.

3,840 mg Subst.: 10,43 mg CO_2, 2,88 mg H_2O.

$C_{22}H_{30}O_4$ Ber. C 73,71 H 8,44 Gef. C 74,08 H 8,39.

Entmethylierung.

Das oben erhaltene Öl wird mit der je 10-fachen Menge Eisessig und frisch destillierter Bromwasserstoffsäure 4 Stunden unter Stickstoff gekocht, wobei sich die Mischung weinrot färbt. Man destilliert Eisessig und Bromwasserstoffsäure i. V. ab, wobei ein dunkler Sirup zurückbleibt. Diesen nimmt man in etwas Äther auf, schüttelt mit Bicarbonatlösung durch und trocknet die Ätherlösung mit Natriumsulfat. Nach Abdestillieren des Äthers hinterbleibt ein dunkler, bald krystallisierender Rückstand, der aus einer Mischung von Cyclohexan und wenig Essigester umkrystallisiert wird. Farblose Nadeln vom Schmelzp. 131°. Die Substanz ist methoxylfrei.

3,571 mg Subst.: 9,34 mg CO_2, 2,47 mg H_2O.

$C_{18}H_{22}O_4$ Ber. C 71,49 H 7,38 Gef. C 71,33 H 7,74.

2-Oxy-3-methoxy-5-propyl-benzaldehyd.

2-Oxy-3-methoxy-5-allyl-benzaldehyd[1]) wird in der 10-fachen Menge Eisessig gelöst und in Gegenwart von Palladium-Bariumsulfat-Katalysator hydriert. Nach Aufnahme der berechneten Menge Wasserstoff wird der Katalysator abfiltriert, der Eisessig abdestilliert und der Rückstand i. V. destilliert. Man erhält ein intensiv gelbes Öl vom Siedep.$_{10}$ 155°.

5,658 mg Subst.: 14,10 mg CO_2, 3,73 mg H_2O. — 5,313 mg Subst.: 8,025 ccm $^n/_{50}$-$Na_2S_2O_3$.

$C_{11}H_{14}O_3$	Ber.	C 68,02	H 7,27	OCH_3 15,98
	Gef.	„ 67,97	„ 7,38	„ 15,62.

2,4-Dinitrophenylhydrazon: Aus Alkohol oder Essigester rote Nadeln vom Schmelzp. 223°.

---

[1]) L. Claisen u. O. Eisleb, A. **401**, 112 (1913).

3,687 mg Subst.: 7,36 mg CO_2, 1,64 mg H_2O. — 3,245 mg Subst.: 0,411 ccm N (19°, 757 mm).

$C_{17}H_{18}O_6N_4$	Ber.	C 54,54	H 4,85	N 14,97
	Gef.	„ 54,45	„ 4,95	„ 14,75.

2,3-Dimethoxy-5-propylbenzaldehyd (VIII).

2-Oxy-3-methoxy-5-propylbenzaldehyd wird in die berechnete Menge 10-proc. Natronlauge eingetragen, wobei sich das intensiv gelbe Natriumsalz ausscheidet. Dann läßt man bei 80° unter heftigem Rühren gleichzeitig Natronlauge und Dimethylsulfat zutropfen, bis das Natriumsalz verschwunden ist. Das ölige Methylprodukt wird in Äther aufgenommen und die Ätherlösung mit Natronlauge und Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Äthers erhält man bei der Destillation i. V. ein farbloses Öl vom Siedep.$_{10}$ 155—156°.

3,232 mg Subst.: 8,19 mg CO_2, 2,33 mg H_2O.

$C_{12}H_{16}O_3$	Ber.	C 69,20	H 7,74	Gef.	C 69,11 H 8,07.

2,4-Dinitrophenylhydrazon: Aus Essigester leuchtend rote Nadeln vom Schmelzp. 202°.

3,435 mg Subst.: 7,01 mg CO_2, 1,58 mg H_2O. — 4,742 mg Subst.: 0,577 ccm N (20°, 761 mm).

$C_{18}H_{20}O_6N_4$	Ber.	C 55,66	H 5,19	N 14,43
	Gef.	„ 55,66	„ 5,15	„ 14,19.

2,3-Dimethoxy-5-propyl-phenylessigsäure (X).

a) *Azlacton.* 70 g 2,3-Dimethoxy-5-propyl-benzaldehyd werden mit 70 g Hippursäure, 32 g wasserfreiem Natriumacetat und 120 ccm Essigsäureanhydrid $2^1/_2$ Stunden am Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten gibt man wenig Alkohol zu und saugt ab. Nach Umkrystallisieren aus wenig Benzol erhält man leuchtend gelbe Prismen vom Schmelzp. 158—159°. Ausbeute 72 g.

3,546 mg Subst.: 9,40 mg CO_2, 1,95 mg H_2O. — 5,400 mg Subst.: 0,200 ccm N (21°, 750 mm).

$C_{21}H_{21}O_4N$	Ber.	C 71,77	H 6,02	N 3,99
	Gef.	„ 72,30	„ 6,15	„ 4,29.

b) *Spaltung des Azlactons zur 2,3-Dimethoxy-5-propyl-phenylbrenztraubensäure* (*IX*). 70 g Azlacton werden unter Stickstoff mit 350 ccm 10-proc. Natronlauge 5 Stunden gekocht, wobei eine klare, gelbbraune Lösung entsteht. In diese wird überschüssiges Schwefeldioxyd eingeleitet und dann die Benzoesäure ausgeäthert. Die in Lösung gebliebene Bisulfitverbindung der Brenztraubensäure wird mit Schwefelsäure zerlegt, wobei sich die Säure als bald erstarrendes Öl abscheidet. Eine Probe wird aus Benzol umkrystallisiert und bildet farblose Nadeln vom Schmelzp. 130—131°.

3,612 mg Subst.: 8,36 mg CO_2, 2,21 mg H_2O. — 3,926 mg Subst.: 8,82 ccm $^n/_{50}$-$Na_2S_2O_3$.

$C_{14}H_{18}O_5$	Ber.	C 63,14	H 6,81	OCH_3 23,31
	Gef.	„ 63,14	„ 6,85	„ 23,24.

c) *2,3-Dimethoxy-5-propyl-phenylessigsäure* (*X*). Die rohe Dimethoxypropyl-phenylbrenztraubensäure wird in überschüssigem Natriumbicarbonat gelöst (ungefähr 600 ccm Lösung) und bei $-5°$ mit 100 ccm 6-proc. Wasserstoffperoxyd versetzt. Nach 48-stündigem Stehen im Eisschrank wird angesäuert, wobei die Phenylessigsäure als bald erstarrendes Öl ausfällt. Ausbeute 39,5 g aus 70 g Azlacton (83 Proc. d. Th.). Aus Cyclohexan farblose Nadeln vom Schmelzp. 93—94°.

3,470 mg Subst.: 8,35 mg CO_2, 2,48 mg H_2O.

$C_{13}H_{18}O_4$	Ber.	C 65,52	H 7,61	Gef.	C 65,63 H 8,00.

(2,3-Dimethoxy-5-propyl-benzyl)-(3,4-dimethoxyphenyl)-keton (*XI*).

10 g 2,3-Dimethoxy-5-propyl-phenylessigsäure werden mit 32 ccm frisch destilliertem Thionylchlorid $2^1/_2$ Stunden auf 60° erhitzt, worauf die Hauptmenge des Thionylchlorids i. V. abdestilliert wird. Die letzten Reste entfernt man durch Aufnehmen des Säurechlorids in Benzol und nochmaliges Abdestillieren i. V. Zu dem als bräunliches Öl zurückbleibenden Säurechlorid gibt man zunächst eine Lösung von 16 g Veratrol in 40 ccm Schwefelkohlenstoff und dann unter Rühren 11,2 g gepulvertes Aluminiumchlorid. Die Mischung wird 2 Stunden auf 60° erwärmt und dann mit verd. Salzsäure zersetzt. Man

nimmt das Öl in Äther auf und schüttelt die Ätherlösung mit Natronlauge und Wasser aus. Aus dem nach Abdestillieren des Äthers hinterbleibenden Rückstand wird durch Abtrennung mit Girard-Reagens (Acethydrazid-pyridinium-chlorid) das Keton XI als rasch erstarrendes Öl erhalten. Aus Alkohol farblose Stäbchen vom Schmelzp. 87—88°. Ausbeute 6,35 g.

3,676 mg Subst.: 9,47 mg CO_2, 2,51 mg H_2O. — 2,493 mg Subst.: 8,37 ccm $^n/_{50}$-$Na_2S_2O_3$.

$C_{21}H_{26}O_5$	Ber.	C 70,36	H 7,31	OCH_3	34,63
	Gef.	„ 70,26	„ 7,64	„	34,72.

α-Oxo-α-(3,4-dimethoxyphenyl)-β-(2,3-dimethoxy-5-propyl-phenyl)-propan (XII).

Das Rohprodukt von XI wird mit einer Lösung von 1,2 g Natrium in 20 ccm abs. Methanol bis zur Lösung erwärmt, worauf das Methanol i. V. abdestilliert wird. Der Rückstand wird mit 15 ccm abs. Benzol versetzt und dann 10 ccm Methyljodid portionsweise zugegeben. Die Mischung erwärmt sich und wird 5 Stunden am Wasserbad gekocht. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels versetzt man den Rückstand mit Wasser und nimmt das Ungelöste in Äther auf. Nach Abdestillieren des Äthers hinterbleibt ein bräunlich gefärbter, rasch krystallisierender Sirup, der nach Umkrystallisieren aus Alkohol oder Cyclohexan farblose Stäbchen vom Schmelzp. 101° bildet.

3,563 mg Subst.: 9,28 mg CO_2, 2,44 mg H_2O. — 2,778 mg Subst.: 8,92 ccm $^n/_{50}$-$Na_2S_2O_3$.

$C_{22}H_{28}O_5$	Ber.	C 70,94	H 7,57	OCH_3	33,33
	Gef.	„ 71,03	„ 7,66	„	33,21.

Reduktion von XII nach Clemmensen.

4,7 g werden mit 20 g amalgamiertem Zinkblech, 25 ccm konz. Salzsäure, 15 ccm Wasser und 20 ccm Toluol 24 Stunden gekocht, wobei noch 70 ccm konz. Salzsäure in kleinen Portionen zugesetzt werden. Man kühlt ab und schüttelt mit Äther aus, der selbst wieder mit Natronlauge ausgewaschen wird. Die Ätherlösung hinterläßt beim Eindampfen einen öligen Rückstand, aus welchem beim Anreiben mit Cyclohexan

und Animpfen unverändertes Ausgangsmaterial auskrystallisiert. Dieses wird abgetrennt und der nicht krystallisierende Anteil wird nochmals in gleicher Weise reduziert und aufgearbeitet. Die nun hinterbleibende Substanz wird i. V. destilliert, wobei nach Abtrennung eines geringen, methoxylärmeren Vorlaufs die Hauptmenge bei einer Badtemperatur von 160° (0,01 mm) übergeht.

4,280 mg Subst.: 11,57 mg CO_2, 3,25 mg H_2O.

$C_{22}H_{30}O_4$ Ber. C 73,71 H 8,44 Gef. C 73,73 H 8,50.

Die Entmethylierung des Reduktionsprodukts von XII wird wie bei dem Methylprodukt von VI durchgeführt. Man erhält eine Substanz, die ebenfalls bei 131° schmilzt und sich in jeder Beziehung mit der beschriebenen identisch erweist.

3,535 mg Subst.: 9,27 mg CO_2, 2,38 mg H_2O.

$C_{18}H_{22}O_4$ Ber. C 71,49 H 7,38 Gef. C 71,52 H 7,53.

Die Mischung beider Substanzen zeigte keine Schmelzpunktserniedrigung.

Oxydation von monomerem Coniferylalkohol mit Ferrichlorid.

5 g krystallisierter monomerer Coniferylalkohol werden in 50 ccm reinem abs. Alkohol gelöst und mit 12 ccm einer wäßrigen Lösung von 5 g Ferrichlorid auf einmal versetzt. Die Lösung färbt sich sofort tiefblau. Nach 1 Stunde ist die Farbe hellgrün geworden. Nach Zugabe von 40 ccm Wasser bleibt die Mischung 24 Stunden im Eisschrank stehen. Man verdünnt mit 150 ccm Wasser, dabei fällt eine gelbe schmierige Substanz aus. Die Flüssigkeit wird abgegossen und der Rückstand 2-mal mit frischem Wasser durchgeknetet; auf diese Weise erhält man ein weißes amorphes Pulver. Die getrocknete Substanz löst sich in Äther und Aceton sehr leicht, ebenso in Eisessig, aus dem sie trotz längeren Stehens nicht mehr ausfällt. Krystallisationsversuche mißlingen. Die gesamte Substanz wird mit Diazomethan methyliert, man erhält ein gelbes Öl, das beim Anreiben mit etwas Wasser als weißer amorpher Niederschlag ausfällt (32 Proc. OCH_3).

2,4 g der methylierten Substanz werden mit 22 g Ätzkali und 10 ccm Wasser 1 Stunde auf 168° erhitzt. Es ist dann eine

dunkle Masse entstanden; man läßt abkühlen, gießt die Flüssigkeit ab und löst den Rückstand in 30 ccm Wasser. Nach der Methylierung mit Dimethylsulfat und Diazomethan wird die Substanz mit Permanganat oxydiert. 0,2 g Veratrumsäure, das sind 8 Proc.

Isohemipinsäure: Nach der Destillation des Methylesters konnten einige Milligramme nachgewiesen werden. Schmelzp. 56°.

Dem unter der Leitung des Herrn Doz. Dr. E. Wiesenberger stehenden Mikrolaboratorium danken wir für die Ausführung der Mikroanalysen.

Über die Einwirkung von Mercuri-acetat auf $\Delta_{6,8}$-Cholestadien-3-ol (Iso-dehydro-cholesterin)*);

Von *A. Windaus, U. Riemann* und *G. Zühlsdorff.*

Mit 4 Figuren im Text.

[Aus dem Allgemeinen Chemischen Universitäts-Laboratorium Göttingen.]

(Eingelaufen am 10. Juni 1942.)

Bei der Einwirkung von überschüssigem Mercuri-acetat auf Iso-dehydro-cholesteryl-p-nitrobenzoat[1]) entstehen eine Anzahl krystallisierter Stoffe, von denen einige wegen ihres stark ungesättigten Charakters bemerkenswert sind.

Aus dem Oxydationsgemisch erhält man direkt einen schwach gelblichen Stoff vom Schmelzp. 210—211°, dessen Analyse auf die Formel $C_{34}H_{43}O_5N$ stimmt; der dem Ester zugrunde liegende Alkohol besitzt also die Formel $C_{27}H_{40}O_2$ und ist, da er von Hydroxylamin nicht verändert wird, wahrscheinlich ein zweiwertiger Alkohol mit 4 Doppelbindungen. Er entsteht also aus dem Iso-dehydro-cholesterin unter Verbrauch von 3 Atomen Sauerstoff.

---

*) Herrn Geheimrat Wieland zum 65. Geburtstag gewidmet.

[1]) Das Iso-dehydro-cholesterin ist beschrieben in der Arbeit von Windaus, Linsert u. Eckhardt, A. 584, 22 (1938).

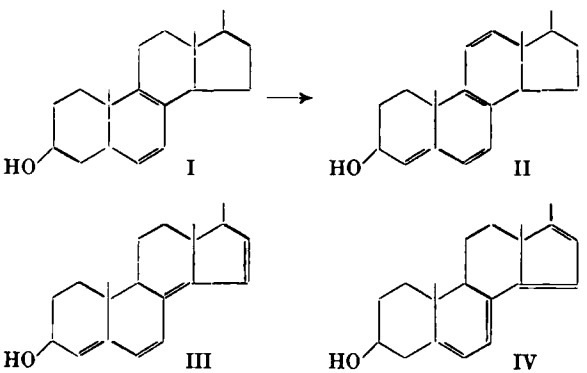
Einen ganz ähnlichen Verlauf nimmt die Behandlung des Iso-dehydro-cholesteryl-m-dinitro-benzoats mit Mercuriacetat. Hier erhält man ein mattgelb gefärbtes Produkt vom Schmelzp. 223—224°, dessen Analyse auf die Formel $C_{34}H_{42}O_7N_2$ paßt. Ihm liegt augenscheinlich derselbe Alkohol $C_{27}H_{40}O_2$ zugrunde.

Das Spektrum dieses Alkohols wurde in der Weise ermittelt, daß das Spektrum des Cholesteryl-p-nitrobenzoats von demjenigen des neuen p-Nitrobenzoats abgezogen wurde. Das so erhaltene Spektrum ähnelt demjenigen des Dehydroergosterins. Der Alkohol $C_{27}H_{40}O_2$ wird also wie dieses 3 konjugierte Doppelbindungen im Ringsystem enthalten; die vierte ist vermutlich isoliert evtl. gekreuzt. Über die Konstitution des Alkohols $C_{27}H_{40}O_2$ vermögen wir nichts weiter auszusagen.

Nach der Abtrennung dieses ersten Produktes wird das übrige Material, das direkt nicht krystallisieren will, verseift. Hierbei entsteht ein in den meisten organischen Lösungsmitteln, vor allem in Äther, sehr schwer löslicher Stoff vom Schmelzp. 228°. Er besitzt die Formel $C_{27}H_{44}O_2$ und ein Absorptionsmaximum bei 248 mμ. Er stellt augenscheinlich einen doppelt ungesättigten zweiwertigen Alkohol dar und entsteht aus dem Iso-dehydro-cholesterin durch Verbrauch eines Atoms Sauerstoff. Beim Behandeln mit m-Dinitrobenzoylchlorid und Pyridin treten beide Hydroxylgruppen in Reaktion. Beim Erhitzen mit Essigsäureanhydrid spaltet der Alkohol Wasser ab und gibt eine krystallisierende Verbindung $C_{29}H_{44}O_2$, das Acetylderivat eines 3-fach ungesättigten Alkohols $C_{27}H_{42}O$. Dieses Acetylderivat ist nicht ganz einheitlich und schwer ganz rein zu erhalten; es besitzt ein Absorptionsmaximum bei 285 mμ. Die Konstitution dieses Cholesta-trienols sowie des Cholesta-diendiols wird in der folgenden Arbeit besprochen.

Aus den Mutterlaugen des Cholesta-dien-diols vom Schmelzp. 228° kommen direkt keine Krystalle mehr; wohl aber erhält man ein sehr charakteristisches Dinitro-benzoat vom Schmelzp. 220°, wenn man die im Vakuum unter Luftabschluß eingedampften Mutterlaugen mit Pyridin und m-Dinitrobenzoylchlorid erwärmt. Das gebildete Dinitro-benzoat ist braunviolett gefärbt, ist in fast allen organischen Lösungs-

mitteln sehr schwer löslich und besitzt die Formel $C_{34}H_{42}O_6N_2$. Es ist also der Ester eines einwertigen Alkohols $C_{27}H_{40}O$, der vier Doppelbindungen enthält und unter Verbrauch von zwei Atomen Sauerstoff aus dem Ausgangsmaterial entstanden ist. Da der Alkohol $C_{27}H_{40}O$ ein Spektrum mit einem Maximum der Absorption bei 355 mμ besitzt, müssen alle vier Doppelbindungen in fortlaufender Konjugation im Ringsystem vorhanden sein. Für dieses Cholesta-tetraenol kommt in erster Linie die Formel II in Betracht; die Bildung des Tetraenols aus dem Iso-dehydro-cholesterin (I) ist dann leicht verständlich, während Stoffe mit den nach dem Absorptionsspektrum möglichen Formeln III und IV nur unter unerwarteten Umlagerungen aus I entstehen könnten.



Ein Sterin mit vier konjugierten Doppelbindungen ist bisher nicht bekannt gewesen; es ist sicher interessant, das chemische und photochemische Verhalten dieser Verbindung kennenzulernen; möglicherweise hat sie auch bemerkenswerte physiologische Eigenschaften.

Die Untersuchung des Cholesta-tetraenols ist allerdings dadurch sehr erschwert, daß es außerordentlich luftempfindlich ist und sein Spektrum sich schon nach kurzem Verweilen des Alkohols an der Luft verändert. Auch das Acetat ist recht unbeständig.

Bei der Oxydation des Iso-dehydro-cholesterins $C_{27}H_{44}O$ mit Mercuriacetat erhält man also unter Verbrauch von 1, 2

und 3 Atomen Sauerstoff die Alkohole $C_{27}H_{44}O_2$ (sowie $C_{27}H_{42}O$), ferner $C_{27}H_{40}O$ und $C_{27}H_{40}O_2$.

Beschreibung der Versuche.

10 g Iso-dehydro-cholesteryl-p-nitrobenzoat werden in 100 ccm Chloroform gelöst und mit 25 g Mercuriacetat in 100 ccm Eisessig versetzt. Es erfolgt rasch eine Ausscheidung von Mercuro-acetat, nach 15 Stunden sind 18,5 g ausgefallen. Die filtrierte Lösung wird dann mit viel Äther versetzt und erst mit Wasser und dann mit verdünnter Sodalösung ausgeschüttelt. Beim Eindampfen der ätherischen Lösung (zuletzt i. V.) hinterbleibt ein Rückstand, der in heißem Aceton gelöst wird. Allmählich scheiden sich schwach gelbliche Nadeln ab, die nach häufigem Umkrystallisiern aus Essigester bei 210 bis 211° schmelzen. Ausbeute 0,45 g[1]).

5,273 mg Subst.: 14,505 mg CO_2, 3,730 mg H_2O.

$C_{34}H_{43}O_5N$ Ber. C 74,82 H 7,94 Gef. C 75,07 H 7,92.

11 mg Subst., 2 ccm Chloroform, l = 1 dm,

$$\alpha = -0{,}64^\circ; \quad [\alpha]_D^{18} = -116{,}2^\circ.$$

Der zugrunde liegende Alkohol von der Formel $C_{27}H_{40}O_2$ ist noch nicht weiter untersucht worden. Das Spektrum befindet sich auf Fig. 1.

Nach der Abscheidung dieses ersten Produktes dampft man die Aceton-mutterlaugen zur Trockne ein, löst den Rückstand in etwa 20 Teilen Alkohol, versetzt mit 100 ccm 10-proc. alkoholischer Kalilauge und erhitzt das ganze $^1/_2$ Stunde auf dem Wasserbad; dann schüttelt man nach Zusatz von Wasser das verseifte Material mit einem Gemisch von 3 Teilen Äther und 1 Teil Benzol mehrfach aus, wäscht die Äther-Benzollösung mit Wasser aus und dampft zur Trockne ein, zuletzt i. V. Der

---

[1]) In genau derselben Weise wurde das Iso-dehydro-cholesteryl-m-dinitrobenzoat mit Mercuriacetat oxydiert. Hier entstanden mattgelbe Nadeln, die aus Aceton umkrystallisiert bei 223—224° schmolzen.

5,500 mg Subst.: 13,915 mg CO_2, 3,470 mg H_2O. — 2,935 mg Subst.: 0,127 ccm N_2 (23°, 758 mm).

$C_{34}H_{42}O_7N_2$ Ber. C 69,11 H 7,17 N 4,74
Gef. „ 69,00 „ 7,06 „ 4,98.

Rückstand wird mit 20 Teilen Äther am Rückflußkühler erwärmt; hierbei bleibt ein weißes Pulver zurück, das nach einigem Stehen abfiltriert und mehrmals aus Chloroform umkrystallisiert wird. Es ist in fast allen organischen Lösungsmitteln außer in Alkohol sehr schwer löslich und bildet verfilzte Nadeln, die bei 228° schmelzen.

4,575 mg Subst.: 13,555 mg CO_2, 4,420 mg H_2O.

$C_{27}H_{44}O_2$ Ber. C 80,94 H 11,06 Gef. C 80,85 H 10,81.

14 mg Subst., 2 ccm Pyridin, l = 1 dm,

$$\alpha = -0{,}36°; \quad [\alpha]_D^{20} = -51{,}4°.$$

Der Stoff besitzt ein Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 248 mμ, ε = 15000 (vgl. Fig. 2).

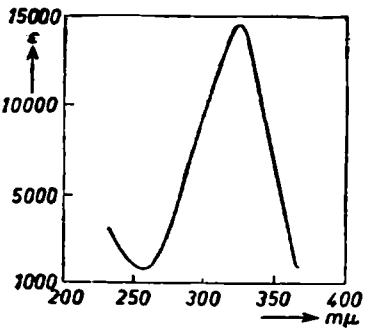


Fig. 1.
Lösungsmittel Äther
Alkohol $C_{27}H_{40}O_2$.

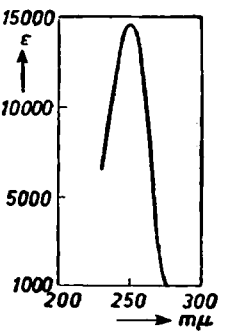


Fig. 2.
Lösungsmittel Äther
Alkohol $C_{27}H_{44}O_2$.

Bis-dinitro-benzoat: Das Diol $C_{27}H_{44}O_2$ vom Schmelzp. 228° wird in Pyridin gelöst und mit dem doppelten Gewicht m-Dinitro-benzoylchlorid 24 Stunden stehen gelassen. Bei der Aufarbeitung erhält man ein fast weißes Bis-dinitro-benzoat, das nach dem Umkrystallisieren aus Aceton-Methylalkohol bei 172° schmilzt[1]).

4,542, 4,388 mg Subst.: 10,320, 10,070 mg CO_2, 2,440 2,400 mg H_2O.

$C_{41}H_{48}O_{12}N_4$ Ber. C 62,42 H 6,13
Gef. „ 62,32, 62,63 „ 6,04, 6,12.

[1]) Die beim Umkrystallisieren des Bis-dinitro-benzoats aus Chloroform entstehenden Krystalle halten Krystallchloroform so fest, daß es auch i. V. bei 90° nur unvollständig entweicht.

Cholesta-trienol: 2 g Cholesta-dien-diol vom Schmelzpunkt 228° werden mit 16 ccm Essigsäureanhydrid übergossen; dann wird das Ganze eine Stunde lang zum Sieden erhitzt, wobei das Diol in Lösung geht. Aus der abgekühlten Lösung scheiden sich lange Nadeln ab, die zunächst unscharf bei 94—100° schmelzen und erst nach sehr häufigem Umkrystallisieren ziemlich konstant bei 102—103° schmelzen; die optische Drehung, die zunächst bei $-22°$ liegt, wird bei häufigem Umkrystallisieren stärker negativ.

4,581 mg Subst.: 13,760 mg CO_2, 4,170 mg H_2O.

$C_{29}H_{44}O_2$ Ber. C 82,00 H 10,45 Gef. C 81,96 H 10,19.

Das Absorptionsspektrum zeigt ein Maximum bei 285 mμ, $\varepsilon = 9100$ (vgl. Fig. 3).

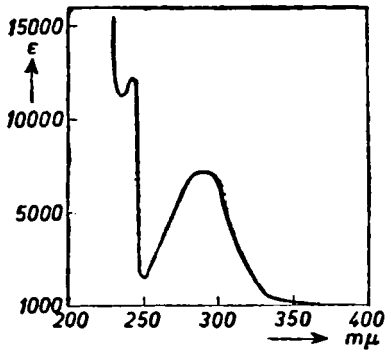


Fig. 3. Lösungsmittel Äther
Acetylderivat des Alkohols $C_{27}H_{42}O$.

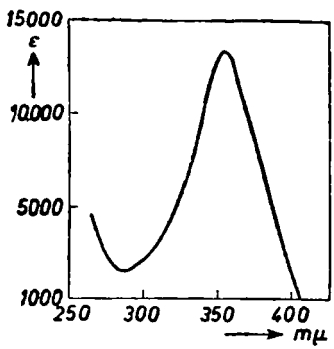


Fig. 4. Lösungsmittel Äther
Alkohol $C_{27}H_{40}O$ (II).

Wird das Acetat mit alkoholischer Kalilauge verseift, erhält man den entsprechenden Alkohol, der in langen Nadeln vom Schmelzp. 99—100° krystallisiert. Beim Liegen an der Luft färbt er sich gelb.

Hydrierung: Wird das Acetat $C_{29}H_{44}O_2$ in Essigäther gelöst und mit Platinmohr und Wasserstoff geschüttelt, geht es in das schon bekannte α-Cholestenol-acetat vom Schmelzp. 76 bis 77° über[1]).

[1]) Auch bei der katalytischen Hydrierung des Cholesta-dien-diols entsteht in glatter Reaktion α-Cholestenol.

Alkohol $C_{27}H_{40}O$ (II).

In den Mutterlaugen des Cholesta-dienols vom Schmelzp. 228° finden sich noch weitere Stoffe, die aber nicht krystallisiert zu erhalten sind. Die Mutterlaugen werden darum i. V. zur Trockne eingedampft; der Rückstand wird in Pyridin gelöst, mit etwa dem gleichen Gewicht m-Dinitrobenzoylchlorid versetzt und $^1/_2$ Stunde auf dem Wasserbad erwärmt. Auf Zusatz von Methylalkohol fallen aus der Lösung rotbraune Krystalle aus, die nach einigem Stehen abfiltriert, mit Methylalkohol ausgewaschen und wiederholt aus Chloroform umkrystallisiert werden. Sie bilden dann voluminöse, rotbraune Nadeln, die bei 219° schmelzen; sie sind in fast allen Lösungsmitteln außer in Chloroform schwer löslich, auch in Aceton.

4,776, 5,078, 4,442 mg Subst.: 12,410, 13,235, 11,570 mg CO_2; 3,110, 3,320, 2,960 mg H_2O. — 3,721, 3,056 mg Subst.: 0,161 ccm N_2 (21,5°, 737 mm); 0,132 ccm N_2 (23,5°, 757 mm).

$C_{34}H_{42}O_6N_2$	Ber.	C 71,04	H 7,37	N 4,87
	Gef.	„ 71,09, 71,08 71,04	„ 7,31, 7,32 7,43	„ 4,86, 4,95
$C_{34}H_{44}O_6N_2$	Ber.	C 70,79	H 7,69	N 4,84.

10 mg Subst., 2 ccm Chloroform, $l = 1$ dm,

$$\alpha = -0{,}75°; \quad [\alpha]_D^{20} = -146°.$$

Die drei Analysen, die von drei verschiedenen Darstellungen stammen, passen so ausgezeichnet auf die Formel $C_{34}H_{42}O_6N$, daß an ihrer Richtigkeit kein Zweifel möglich erscheint.

Zur Gewinnung des vierfach ungesättigten Alkohols $C_{27}H_{40}O$ wird das rotbraune Dinitrobenzoat unter Luftausschluß mit alkoholischer Kalilauge verseift und das Reaktionsprodukt durch Zusatz von Wasser gefällt, abfiltriert und aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Wegen der großen Luftempfindlichkeit des Stoffes müssen die Operationen möglichst schnell und möglichst unter Luftabschluß erfolgen.

Der Alkohol beginnt bei 108° zu sintern und ist bei 115° geschmolzen. Es ist möglich, daß der vierfach ungesättigte Alkohol und das Acetat schon durch den Luftsauerstoff etwas verändert sind und die angegebenen Schmelzpunkte nicht ganz zutreffen.

13,9 mg Subst., 2 ccm Chloroform, $l = 1$ dm,

$$\alpha = -227^0; \quad [\alpha]_D = -311^0.$$

Das Absorptionsspektrum besitzt ein Maximum bei 355 mμ, $\varepsilon = 13500$ (vgl. Fig. 4). Beim Liegen des Alkohols an der Luft ändert sich das Spektrum rasch.

Das *Acetat*, das mit Essigsäureanhydrid und Pyridin dargestellt wurde, krystallisiert aus Aceton-Methylalkohol in langen, farblosen Nadeln vom Schmelzp. 114—119°. Auch dieser Stoff ist sehr luftempfindlich.

10,4 mg Subst., 2 ccm Chloroform, $l = 1$ dm,

$$\alpha = -1{,}15^0; \quad [\alpha]_D^{20} = -225{,}5^0.$$

Der deutschen Forschungsgemeinschaft, der I. G. Farbenindustrie A.-G., Werk Elberfeld, und der Chemischen Fabrik E. Merck-Darmstadt, danken wir vielmals für die Unterstützung unserer Arbeiten.

Über die Einwirkung von Bleitetra-acetat auf Iso-dehydro-cholesterin;

von *A. Windaus, U. Riemann, H. H. Rüggeberg* und *G. Zühlsdorff.*

[Aus dem Allgemeinen Chemischen Universitäts-Laboratorium Göttingen.]

(Eingelaufen am 12. Juli 1942.)

Im Anschluß an unsere früheren Versuche über die Oxydation des Iso-dehydro-cholesterins bzw. seiner Ester mit Benzopersäure[1]) und mit Mercuriacetat[2]) haben wir auch Bleitetraacetat auf Iso-dehydro-cholesteryl-p-nitrobenzoat einwirken lassen. Hierbei erhält man nach der Aufarbeitung zunächst einen in Aceton ziemlich schwer löslichen, in Methyl-

[1]) Windaus, Linsert u. Eckhardt, A. 534, 22 (1938).
[2]) Vgl. die vorhergehende Arbeit.

alkohol unlöslichen Stoff, der 2 Wasserstoffatome weniger enthält als das Ausgangsmaterial:

$$C_{27}H_{43}OCOC_6H_4NO_2 \longrightarrow C_{27}H_{41}OCOC_6H_4NO_2.$$

Das Bleiacetat wirkt also hier anders als beim Ergosterin oder Vitamin D. Bei diesen Verbindungen werden 2 Hydroxylgruppen (bzw. Acetatreste) an die Doppelbindung C_5C_6 addiert. Diese Doppelbindung fehlt aber im Iso-dehydro-cholesterin, und die Oxydation verläuft darum in anderer Weise.

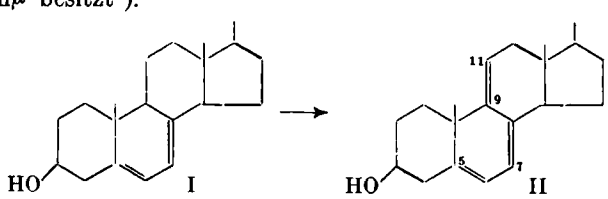
Das neue p-Nitrobenzoat schmilzt bei 168°; bei der Verseifung entsteht ein Alkohol vom Schmelzp. 100° ($[\alpha]_D = -81°$), der ein Acetat vom Schmelzp. 103—104° liefert. Seine Hauptabsorptionsbande zeigt ein Maximum bei 285 mμ; für die optische Drehung ergibt sich bei Verwendung von Chloroform als Lösungsmittel $[\alpha]_D = -77°$. Bei der katalytischen Hydrierung liefert es glatt α-Cholestenol. In welcher Beziehung dieses Trien-ol zu den früher auf anderem Wege gewonnenen steht, wird weiter unten erörtert.

Die Mutterlaugen, aus denen das Cholestatrien-ol-p-nitrobenzoat auskrystallisiert ist, werden eingedampft und liefern einen Rückstand, der nicht krystallisieren will und darum mit alkoholischer Kalilauge verseift wird. Das Verseifungsprodukt besteht aus einem Gemisch verschiedener Cholestadien-diole $C_{27}H_{44}O_2$. Seine Zusammensetzung scheint weitgehend abhängig zu sein von sehr geringen Abänderungen der Versuchsbedingungen. Aus ätherischer Lösung scheidet sich daraus in wechselnder Menge ein in Äther sehr schwer lösliches Cholestadien-diol vom Schmelzp. 228° ab, das in besserer Ausbeute aus dem Iso-dehydrocholesterin mit Mercuriacetat erhalten worden ist[1]). Die in Äther leichter löslichen Cholestadien-diole haben wir über die Digitonin-Additionsprodukte gereinigt und sie dabei in wohlausgebildeten Krystallen erhalten, die aber ganz unscharf zwischen 168—188° schmelzen; sie werden in ein in feinen Nadeln krystallisierendes Bis-dinitro-benzoat verwandelt, das scharf bei 176° schmilzt und richtige Analysenzahlen ergibt; durch alkoholische Kalilauge wird es zu einem krystallisierten Cholestadien-diol vom Schmelzp. 196° verseift.

[1]) a. a. O.

Wie schon in der vorhergehenden Arbeit mitgeteilt worden ist, liefert das Cholestadien-diol vom Schmelzp. 228° beim Erhitzen mit Essigsäureanhydrid ein schön krystallisiertes Cholestatrienol-acetat; auch das Cholestadien-diol vom Schmelzp. 196°, ja selbst die letzten nicht mehr krystallisierenden Mutterlaugen-Rückstände geben unter denselben Bedingungen ein ganz ähnliches Cholestatrienol-acetat. Dieses ist in seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften dem oben beschriebenen Trienol-acetat sehr ähnlich; es schmilzt allerdings unschärfer und unterscheidet sich von ihm durch die optische Drehung, die für $[\alpha]_D$ nicht $-77°$, sondern etwa $-30°$ beträgt.

Wir haben dieses Acetylderivat anfangs für eine reine Verbindung gehalten, es hat sich aber dann herausgestellt, daß es ein Gemisch ist. Als Hauptbestandteil enthält es das Acetat $[\alpha]_D = -77°$, dem aber 10—20 Proc. eines stark positiv drehenden Cholestatrienol-acetats beigemischt sind. Nach seinen Eigenschaften ist dieses positiv drehende Trien-ol identisch mit dem $\Delta_{5,7,9(11)}$-Cholestatrien-ol-(II), das aus dem 7-Dehydro-cholesterin (I) oder dem Iso-pyro-vitamin D_3 mit Mercuri-acetat entsteht und seine Hauptabsorption bei 315 mμ besitzt[1]).



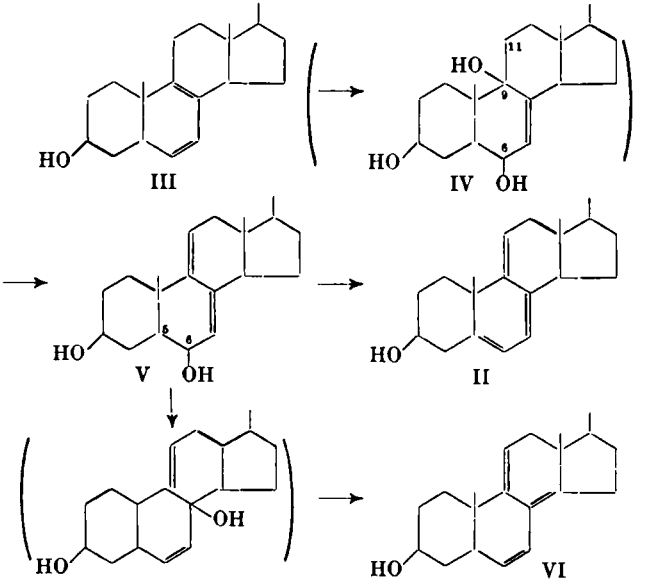
Auf Grund des vorliegenden Materials kommen wir zu folgenden Vostellungen über die Konstitution des Cholestadiendiols Schmelzp. 228° und des Cholestatrienols $[\alpha]_D = -81°$:

Bei der Bildung des Cholestadien-diols vom Schmelzp. 228° aus dem Iso-dehydro-cholesterin (III) tritt formal nur eine Hydroxyl-gruppe an Stelle eines Wasserstoffatoms in das Molekül ein. Wenn tatsächlich die Reaktion so einfach verliefe, müßten die Spektren des Iso-dehydro-cholesterins und

[1]) Windaus, Deppe u. Rcosen-Runge, A. 537, 1 (1938).

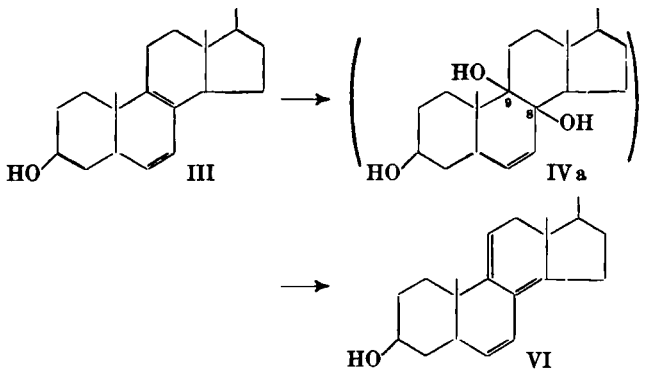
des Cholestadien-diols fast identisch sein. Das ist aber durchaus nicht der Fall. Das Isodehydro-cholesterin hat seine Hauptbande bei 270—280 mμ, wie ein Sterin mit konjugierten Doppelbindungen in einem einzigen Ringe; das Cholestadien-diol hat das Maximum seiner Absorption bei 248 mμ, wie ein Sterin mit konjugierten Doppelbindungen in 2 Ringen. Sehr bemerkenswert ist es ferner, daß das Cholestadien-diol beim Behandeln mit m-Dinitro-benzoyl-chlorid und Pyridin schon in der Kälte einen Di-ester gibt. Es ist also — nach vielfachen Erfahrungen in der Sterinreihe — sehr wahrscheinlich, daß beide Hydroxylgruppen sekundären Alkohol-gruppen angehören. Danach erscheint uns der folgende Reaktionsverlauf der wahrscheinlichste:

Beim Behandeln von Iso-dehydro-cholesterin (III) mit Bleitetra-acetat addieren sich 2 Hydroxylgruppen (oder Acetatreste) in 1,4-Stellung an die Kohlenstoffatome 6 und 9. Das dabei zunächst entstehende Oxydationsprodukt (IV) spaltet sehr leicht zwischen C_9 und C_{11} Wasser ab und liefert das Cholestadien-diol vom Schmelzp. 228°, dem wir die Konstitution V zuschreiben.



Dieses Cholestadien-diol (V) spaltet beim Erhitzen mit Essigsäureanhydrid Wasser ab, und zwar zum geringen Teil in normaler Weise zwischen C_5 und C_6; hierbei entsteht das schon bekannte Cholestatrienol (II). In der Hauptsache erfolgt aber bei der Wasserabspaltung eine Allyl-umlagerung, und es bildet sich über ein nicht gefaßtes Zwischenprodukt das Cholestatrienol VI. Das Cholestadien-diol vom Schmelzp. 196° verhält sich bei der Wasserabspaltung wie sein Isomeres vom Schmelzpunkt 228°. Wir vermuten, daß sich die beiden Diole nur durch die sterische Anordnung von Wasserstoff und Hydroxyl am Kohlenstoffatom 6 unterscheiden.

Bei der Oxydation des Iso-dehydro-cholesterins mit Bleitetraacetat entsteht auch direkt das reine Cholestatrienol VI. Wir nehmen an, daß sich 2 Hydroxylgruppen (oder Acetatreste) an C_8 und C_9 addieren und daß dann sofort 2 Mol Wasser (oder Essigsäure) abgespalten werden.

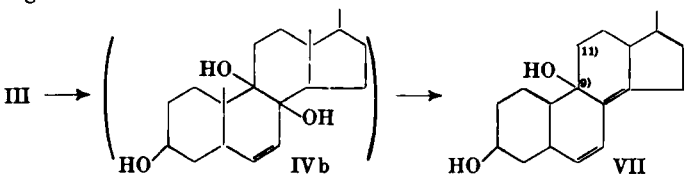


Sehr bemerkenswert ist es, daß auch bei der Oxydation des Iso-dehydro-cholesterins mit 1 Mol Benzopersäure ein Cholestadien-diol und ein Cholestatrienol erhalten worden sind, die sich durch ihre Schmelzpunkte (143° und 159°) weitgehend von den mit Bleitetraacetat erhaltenen unterscheiden, aber fast genau dieselben Absorptionsspektren besitzen wie diese. Es erscheint darum nötig, die Beziehungen dieser isomeren Verbindungen zueinander zu erörtern.

Das Cholestadien-diol vom Schmelzp. 143° mit einem Absorptionsmaximum bei 248 mμ wird wie das 228°-Isomere zwei

konjugierte Doppelbindungen in 2 Ringen enthalten. Bei der Acetylierung liefert es im Gegensatz zu seinen Isomeren nur einen Mono-ester; es wird also nicht zwei sekundäre Alkoholgruppen, sondern eine sekundäre und eine tertiäre enthalten.

Auf Grund dieser Tatsachen haben Windaus, Linsert und Eckhardt[1]) dem Cholestadien-diol 143° die Formel VII erteilt und seine Bildung aus dem Iso-dehydro-cholesterin folgendermaßen formuliert:



Diese Formel erscheint uns auch heute noch als die bei weitem wahrscheinlichste.

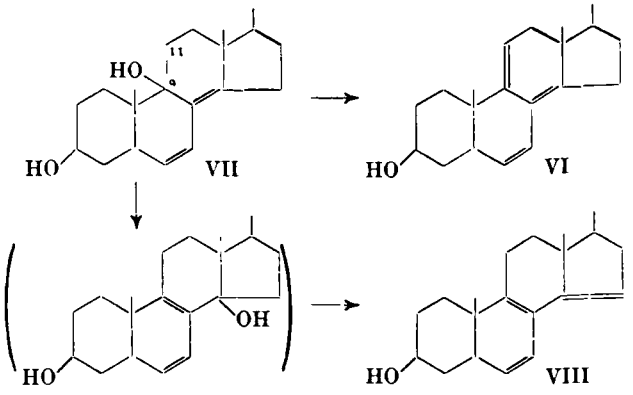
Beim Erwärmen mit Essigsäureanhydrid spaltet das Diol 143° 1 Mol Wasser ab und gibt ein Cholestatrienol vom Schmelzp. 159°, dem damals dieselbe Formel VI gegeben worden ist, die wir jetzt dem Trien-ol vom Schmelzp. 100° zuerteilen.

Um diese Unstimmigkeiten zu klären, haben wir die früheren Versuche nachgeprüft und haben gefunden, daß auch bei der Wasserabspaltung aus dem Dien-diol 143° (VII) zwei Isomere gebildet werden. In geringer Menge entsteht durch direkte Wasserabspaltung zwischen C_9 und C_{11} das Cholestatrienol VI vom Schmelzp. 100°; als Hauptprodukt erhält man ein anderes vom Schmelzp. 159°. Wir nehmen an, daß dieses, das bei der katalytischen Hydrierung ebenfalls in α-Cholestenol übergeht, durch eine Allylumlagerung entsteht und erteilen ihm darum die Formel VIII.

Wir kennen also jetzt drei verschiedene Cholestatrienole (Tetra-dehydro-cholesterine), und wir glauben, daß die Konstitutionsformeln II, VI und VIII, die wir für sie abgeleitet haben, zutreffen.

---

[1]) a. a. O.



Beschreibung der Versuche.

Darstellung des Cholestatrienols (VI) und des Cholestadien-diols (V).

15 g Iso-dehydro-cholesteryl-p-nitrobenzoat werden in 150 ccm Chloroform gelöst; zu der Lösung gibt man 100 ccm Eisessig und allmählich unter Kühlung mit Eiswasser 20 g Bleitetraacetat und läßt das Ganze etwa 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Nach dieser Zeit ist meist noch eine schwache Reaktion auf Bleitetraacetat vorhanden; man fügt dann eine kleine Menge (1 ccm) Glycerin und viel Wasser hinzu und schüttelt das organische Material mit Äther aus. Die mit Wasser und verdünnter Sodalösung gewaschenen Ätherextrakte werden eingedampft und der Rückstand mit etwa 400 ccm Methylalkohol ausgekocht; das nach dem Erkalten der Lösung unlösliche Material wird von der Lösung[1]) getrennt und in wenig warmem Aceton gelöst. Aus der acetonischen Lösung scheiden sich allmählich gelbe Nadeln ab, die aus Essigester oder aus Aceton-Methylalkohol umkrystallisiert werden. Die Krystalle schmelzen bei 167—168° zu einer trüben Schmelze und geben mit dem ähnlich schmelzenden Ausgangsmaterial eine deutliche Depression; sie enthalten 2 Atome Wasserstoff weniger als dieses. Ausbeute etwa 2 g.

[1]) Über die Aufarbeitung der methylalkoholischen Lösung vgl. weiter unten.

5,263 mg Subst.: 14,765 mg CO_2, 4,020 mg H_2O. — 3,307 mg Subst.: 0,084 ccm N_2 (27,5°, 754 mm).

$C_{34}H_{45}O_4N$	Ber.	C 76,80	H 8,53	N 2,70
	Gef.	„ 76,53	„ 8,55	„ 3,12.

2 g des Cholestatrienol-p-nitrobenzoats werden 1 Stunde mit alkoholischer Kalilauge erwärmt; das auf Zusatz von Wasser ausfallende Verseifungsprodukt wird abfiltriert und aus Methylalkohol umkrystallisiert. Es bildet lange Nadeln, die bei etwa 100° schmelzen.

12,3 mg Subst., 2 ccm Chloroform, $l = 1$ dm,

$$(\alpha) = -0{,}5°; \quad [\alpha]_D^{17} = -81{,}2°.$$

Beim Liegen an der Luft färbt sich das Cholestatrienolgelb.

Es liefert ein sehr charakteristisches *Acetat*, das direkt aus der erkalteten Lösung auskrystallisiert, wenn man 1 g des Alkohols mit 8 g Essigsäureanhydrid 1 Stunde am Rückflußkühler erhitzt. Das Acetat wird aus Äther-Methylalkohol umkrystallisiert; hierbei kommt es in langen Nadeln, die bei 103—104° schmelzen.

16,5 mg Subst., 2 ccm Chloroform, $l = 1$ dm,

$$(\alpha) = -0{,}64°; \quad [\alpha]_D^{17} = -77{,}6°.$$

4,943 mg Subst.: 14,855 mg CO_2, 4,560 mg H_2O.

$C_{25}H_{44}O_2$ Ber. C 82,02 H 10,45 Gef. C 82,01 H 10,32.

Außer dem Acetat haben wir das *Dinitro-benzoat* des Alkohols mittels Pyridin und m-Dinitrobenzoylchlorid bereitet. Es ist in Alkohol schwer löslich, und läßt sich aus Aceton oder aus Chloroform-Äthylalkohol umkrystallisieren. Es bildet gelbe Nadeln vom Schmelzp. 198°.

12,0 mg Subst., 2 ccm Chloroform, $l = 1$ dm,

$$(\alpha) = -0{,}39°; \quad [\alpha]_D^{17} = -65{,}0°.$$

4,781 mg Subst.: 12,375 mg CO_2, 3,260 mg H_2O.

$C_{34}H_{44}O_6N_2$ Ber. C 70,80 H 7,69 Gef. C 70,63 H 7,63.

Das Dinitro-benzoat haben wir dann verseift und das erhaltene Trienol wieder acetyliert, und das Acetat vom Schmelzp. 103°, $[\alpha]_D = 77°$ zurückerhalten.

Die bei der Isolierung des Cholestatrienol-p-nitrobenzoats angesammelten Mutterlaugen werden eingedampft; aus dem Rückstand gelingt es nicht, weitere Krystalle zu erhalten. Das Material wird darum durch 1-stündiges Erwärmen mit alkoholischer Kalilauge verseift und das Verseifungsprodukt mit

Äther extrahiert. Der mit Wasser gewaschene Ätherextrakt wird eingedampft und der Rückstand mit Äther bzw. mit Äther-Petroläther stehen gelassen. Aus dieser Lösung scheidet sich — in sehr wechselnder Menge — ein weißes Pulver ab, das nach dem Umkrystallisieren aus Chloroform-Äther bei 228° schmilzt und genau dieselben Eigenschaften besitzt wie das mittels Mercuriacetat gewonnene Cholestadien-diol vom gleichen Schmelzpunkt.

4,539 mg Subst.: 13,490 mg CO_2, 4,410 mg H_2O.

$C_{27}H_{44}O_2$ Ber. C 80,94 H 11,06 Gef. C 81,10 H 10,95.

18,9 mg Subst., 2 ccm Chloroform, $l = 1$ dm,

$$(\alpha) = -0{,}46^0; \quad [\alpha]_D^{18} = -48{,}7^0.$$

Die ätherische Lösung, aus der sich das Cholestadiendiol vom Schmelzp. 228° abgeschieden hat, wird eingedampft und der gelbbraune, harzige Rückstand in alkoholischer Lösung mit Digitonin behandelt. Das gebildete Digitonin-additionsprodukt wird abfiltriert und mit Pyridin-Äther wieder zerlegt. Das aus Aceton umkrystallisierte Material bildet Nadeln; es ist augenscheinlich noch ein Gemisch, da es ganz unscharf zwischen 170—190° schmilzt. Es wird darum mit Pyridin und Dinitro-benzoyl-chlorid behandelt und gibt ein in verfilzten Nadeln krystallisierendes Bis-dinitro-benzoat vom Schmelzp. 176°.

5,303 mg Subst.: 12,125 mg CO_2, 2,980 mg H_2O.

$C_{41}H_{48}O_{12}N_4$ Ber. C 62,43 H 6,13 Gef. C 62,40 H 6,29.

Dieses Bis-dinitro-benzoat wird wieder mit äthylalkoholischer Lauge verseift und liefert ein in Nadeln krystallisierendes Cholestadien-diol vom Schmelzp. 196°. Ob dieser Stoff ganz einheitlich ist, kann nicht mit voller Sicherheit behauptet werden.

4,858 mg Subst.: 19,420 mg CO_2, 4,520 mg H_2O.

$C_{27}H_{44}O_2$ Ber. C 80,94 H 11,06 Gef. C 81,00 H 11,10.

Wasserabspaltung aus dem Cholestadiendiol V.

Wir haben nun den Stoff 228°, den wir für einheitlich halten, den Stoff vom Schmelzp. 196° und auch die nicht

krystallisierenden Mutterlaugen mit der 8-fachen Menge Essigsäureanhydrid 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. In allen Fällen scheidet sich aus der Lösung (evtl. nach Impfen) ein schön krystallisierendes Cholestatrienol-acetat aus. Es schmilzt zunächst unscharf zwischen 94—100° und zeigt eine Drehung von $[\alpha]_D$ etwa $-28°$. Durch häufiges Umkrystallisieren wird der Schmelzpunkt schärfer, etwa 97—100°, und ein stärker negativ drehendes Acetat sammelt sich in den schwerer löslichen Fraktionen an; die schwerst lösliche Fraktion zeigt nach 5-maligem Umkrystallisieren die Drehung $[\alpha]_D = -44{,}6°$, die löslichste Fraktion $[\alpha]_D = -20°$.

Wir haben die schwächer negativ drehenden Acetylderivate vereinigt, mit alkoholischer Kalilauge verseift und die Verseifungsprodukte 20 Minuten mit Pyridin und m-Dinitrobenzoylchlorid auf dem Wasserbad erwärmt. Auf Zusatz von Methylalkohol zu dem Reaktionsgemisch fällt das gebildete Dinitrobenzoat krystallisiert aus und wird aus Aceton umkrystallisiert. Hierbei kommt zunächst ein Dinitro-benzoat von orangeroter Farbe heraus; es besitzt einen Schmelzpunkt von 184—190° und für $[\alpha]_D$ eine Drehung von $+46{,}2°$. Aus den Mutterlaugen kommt langsam ein gelbes Dinitro-benzoat, das unscharf zwischen 184—196° schmilzt und für $[\alpha]_D$ die Drehung $-48°$ zeigt.

Das positiv drehende Dinitro-benzoat wird mehrmals mit Äther ausgekocht und aus Chloroform-Alkohol unkrystallisiert; es schmilzt dann bei 195—199° und dreht für $[\alpha]_D$ bei $+128°$. Das Absorptionsspektrum des entsprechenden Alkohols zeigt ein Maximum bei 315 mμ. Zum Vergleich geben wir die Daten für das Dinitrobenzoat des Trienols II: Schmelzp. 205°, $[\alpha]_D = +161°$, Absorptionsmaximum 315 mμ. Wir bezweifeln nicht, daß unser Dinitro-benzoat zur Hauptsache aus dem Dinitrobenzoat des Cholestatrienols II besteht.

Die negativ drehenden Dinitro-benzoate dieses Versuchs haben wir in Benzol-Benzin 1 : 4 gelöst und durch eine Aluminiumoxydsäule geschickt; eluiert wird mit einem Gemisch von Benzol-Methylalkohol 1 : 1. Es scheint, daß das rote Dinitro-benzoat an dem Aluminiumoxyd sehr festgehalten oder zerstört wird. Das aus der gelben Zone eluierte Dinitro-

benzoat zeigt für $[\alpha]_D = -66^0$; es wird in das Acetyl-derivat verwandelt, das für $[\alpha]_D = -62{,}7^0$ ergibt und bei 103° schmilzt. Es gibt mit dem Acetat des reinen Cholestatrienols VI keine Schmelzpunktserniedrigung.

Über die Einwirkung von Benzopersäure auf Iso-dehydro-cholesterin.

Hierüber schreiben Windaus, Linsert und Eckhardt[1]), daß bei der Wasserabspaltung aus dem Cholestadien-diol (VII) mittels Essigsäureanhydrid ein Acetat eines Trien-ols entstehe, das unscharf bei 110 bis 118° schmelze; der daraus gewonnene Alkohol zeige zunächst den Schmelzp. 105—110°; durch weiteres Umkrystallisieren gelange man zu einem scharf und konstant bei 159° schmelzenden Cholestatrienol; das diesem Alkohol entsprechende Acetat schmelze bei 148°.

Schon aus diesen Angaben geht hervor, daß bei der Wasserabspaltung aus dem Cholestadien-diol (VII) zunächst ein Gemisch erhalten wird.

Bei Wiederholung dieser Versuche haben wir durch Umkrystallisieren des ursprünglichen Acetatgemisches aus Aceton-Methylalkohol direkt das Acetyl-derivat vom Schmelzp. 148° gewinnen können. Aus den Mutterlaugen kann man durch fraktionierte Krystallisation neben unscharf schmelzenden Gemischen auch einen Anteil erhalten, der bei 103° schmilzt, für $[\alpha]_D$ die Drehung -85^0 ergibt und keine Schmelzpunktserniedrigung mit dem reinen Acetat des Cholestatrienols (VI) gibt.

Der deutschen Forschungsgemeinschaft, der I. G. Farbenindustrie A.-G., Werk Elberfeld, und der chemischen Fabrik E. Merck-Darmstadt, sprechen wir für die Unterstützung unserer Arbeiten unseren Dank aus.

[1]) a. a. O.

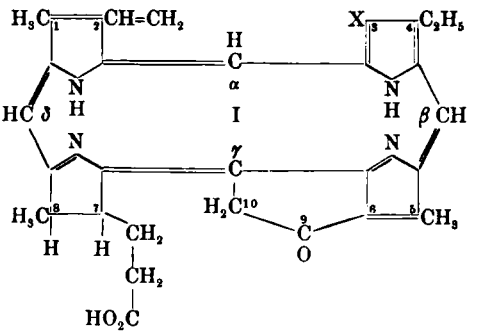
Übergang von der Chlorophyll b- in die a-Reihe*)[1]);

von *Hans Fischer und Heinz Gibian.*

[Aus dem Organisch-chemischen Institut der Technischen Hochschule München.]

(Eingelaufen am 15. Juli 1942.)

Chlorophyll a und b, die beiden in ziemlich konstantem Mengenverhältnis zueinander stehenden Komponenten des Blattfarbstoffs, unterscheiden sich, wie eingehende Untersuchungen[2]) gezeigt haben, lediglich in einem Substituenten: Die 3-Methylgruppe der a-Reihe ist bei den b-Körpern durch eine Formylgruppe ersetzt, deren Vorhandensein einen beträchtlichen spektralen Unterschied bewirkt.



Nachdem kürzlich[3]) mittels Hydrazinhydrat/Natriummethylat nach Wolff-Kishner (WK.) bei Arbeiten unter milden Bedingungen (115°) eine Reduktion der 9-Ketogruppe von Pyrophäophorbid a (I, $X = CH_3$) unter Erhaltung der „überzähligen" Wasserstoffatome 7 und 8 des Chlorinsystems gelungen war, lag es nahe, die gleiche Reaktion auf das Pyro-

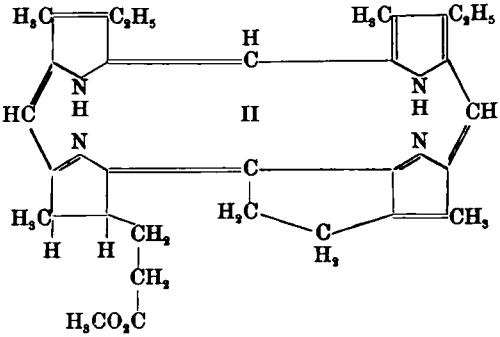
*) Heinrich Wieland zum 65. Geburtstag.

[1]) 114. Mitteilung zur Kenntnis der Chlorophylle; 113. Mitteilung A. 550, 252 (1942).

[2]) Vgl. Fischer u. Orth, Die Chemie des Pyrrols, II/2, S. 27ff.

[3]) H. Fischer u. H. Gibian, A. 550, 208 (1942).

phäophorbid b (I, X = CHO) zu übertragen, in der Hoffnung, daß hier unter gleichzeitiger Reduktion der 3-Formylgruppe derselbe Mesodesoxopyrophäophorbid **a**-methylester (II) wie oben zu erhalten sein würde.



In der Tat konnte so ein nach Spektrum, Schmelz- und Mischschmelzpunkt, Extraktionszahl, Krystallaussehen, Debye-Scherrer-Diagramm und Analysendaten mit früher hergestelltem Material identischer Körper gewonnen werden, der sich wie dieses als optisch-inaktiv erwies.

Früher schon hatten H. Fischer und Mitarbeiter[1]) aus Pyrophäophorbid b mittels der WK.-Reaktion unter energischeren Arbeitsbedingungen (180°) Desoxophyllerythrin — die Muttersubstanz des Chlorophyll a — erhalten und damit die Ableitung unter anderem auch des Chlorophyll b von Ätioporphyrin III sichergestellt.

Nachdem nunmehr Pyrophäophorbid **b** in Meso-desoxopyrophäophorbid **a** überführt werden konnte, ist somit *zum erstenmal auch auf direktem Wege die allernächste Verwandtschaft der Chlorophyll a- und der b-Reihe erwiesen.*

Es stand noch der Beweis der *sterischen* Identität der beiden Reihen bezüglich der Kohlenstoffatome 7 und 8 des Ringes IV aus[2]). Auch dieser konnte jetzt geführt werden.

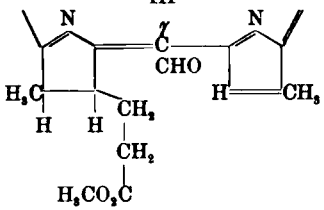
Mit 100-proc. Ameisensäure und Palladium als Katalysator konnte aus Pyrophäophorbid b ein Chlorin erhalten werden, das sich nach Spektrum, Schmelz- und Mischschmelz-

[1]) H. Fischer, E. Lakatos u. J. Schnell, A. **509**, 212 (1934).
[2]) Vgl. H. Fischer u. H. Gibian, a. a. O. S. 214.

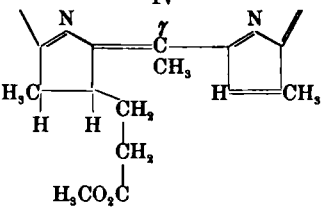
punkt, Krystallisationseigenschaften, Extraktionszahl, Debye-Scherrer-Diagramm und Analysendaten mit aus Pyrophäophorbid a erhaltenem aktiven Mesodesoxopyrophäophorbid a-methylester auch bezüglich des optischen Drehungsvermögens als identisch erwies.

Damit ist jetzt auch die gleiche räumliche Substituentenanordnung in beiden Chlorophyllreihen bewiesen.

III



IV



Weiterhin wurde die Einwirkung der WK.-Reaktion auf *Mesopurpurin 3-methylester* (III) versucht. Die hier *meso*-ständige Formylgruppe wurde glatt reduziert: Neben etwas Phylloporphyrin war inaktives Mesophyllochlorin (IV) entstanden, das als Ester sich in allen seinen Eigenschaften, besonders auch dem Röntgendiagramm, mit auf anderem Wege gewonnenem natürlichen[1]) wie besonders auch mit synthetischem Material als identisch erwies. Damit ist neuerlich die Realität der erfolgten Inaktivierung erwiesen, ferner die mehrfache Anwendbarkeit der WK.-Reaktion zur Reduktion von Carbonylgruppen bei Chlorophyllderivaten gezeigt: Wie die isocyclische Ketogruppe ist auch die seiten-(3-)ständige und die Meso-(γ)-formylgruppe hier glatt reduzierbar. Ob dies ganz allgemein möglich ist, soll noch geprüft werden.

Von Interesse war nun noch, ob mittels der WK.-Reaktion Inaktivierung eines Chlorins *ohne* gleichzeitige Reduktion einer etwa vorhandenen Carbonylgruppe gelänge.

Während bei 115° aus Pyrophäophorbid a (I, $X = CH_3$) neben Desoxophyllerythrin ausschließlich inaktives Meso-*desoxo*pyrophäophorbid a entsteht, erhält man beim Arbeiten bei 100°, und zwar sowohl im *offenen* Gefäß[2]) wie im Bomben-

[1]) H. Fischer u. H. Gibian, a. a. O. S. 217.

[2]) Vgl. dagegen H. Fischer u. H. Gibian, a. a. O. S. 222—223.

rohr, in sehr guter Ausbeute einen Körper, der sich nach Extraktionszahl, Spektrum und Eigenschaften (Oximbildung) als ein Mesopyrophäophorbid a (I, $X = CH_3$, statt der 2-Vinyl- eine Äthyl-gruppe) erweist, das als Ester jedoch bei 206° schmilzt, im Gegensatz zu anderem durch katalytische Hydrierung mit Palladium/Wasserstoff erhältlichen Material vom Schmelzp. 232°.

Die optische Untersuchung in Aceton als Lösungsmittel ergab zunächst nicht ganz eindeutige Befunde, so daß mit der Möglichkeit des Vorliegens eines Diastereomeren[1]) gerechnet werden mußte. Die Anwendung der WK.-Methode bei 115° ergab den normalen inaktiven Meso-desoxopyrophäophorbid a-methylester vom Schmelzp. 212°, der stets auch als Nebenprodukt der Darstellung obigen „isomeren" Mesopyrophäophorbids auftrat (identifiziert unter anderem auch mittels Debye-Scherrer-Diagramm).

Der *gleiche inaktive* Ester entstand nun aber vor allem auch direkt durch Reduktion mit Ameisensäure/Palladium. Nachdem eine Inaktivierung durch dieses Reagens bisher nicht beobachtet worden war, konnte es sich nur noch bei dem Ausgangskörper um bereits inaktives Material handeln. Diese Annahme wurde bestätigt durch Drehungsmessungen in 30-proc. Salzsäure als Lösungsmittel. Während gewöhnlicher Mesopyrophäophorbid a-methylester (Schmelzp. 232°) dabei Ablesungen bis zu 0,81° ergab, konnten bei gleicher Konzentration bei dem isomeren Körper (Schmelzp. 206°) keine Werte über 0,02°, also außerhalb des Meßfehlerbereiches, erhalten werden. Es dürfte sich somit bei diesem Körper um den racemischen Mesopyrphäophorbid a-methylester handeln, der damit das derzeit leichtest zugängliche inaktive Chlorin darstellt.

Das auf übliche Weise hiervon bereitete Zinkkomplexsalz mit dem bemerkenswert niederen Schmelzp. 158° zeigte ebenfalls keine meßbare optische Aktivität.

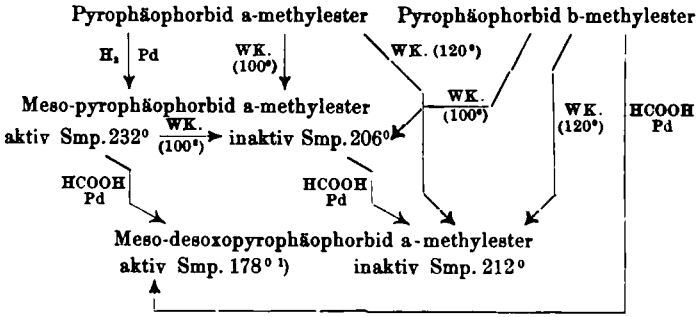
Nun wurde die WK.-Reaktion bei *100°* noch bei Pyrophäophorbid b untersucht in der Hoffnung, vielleicht einen inaktiven Körper der b-Reihe, unter Erhalt also auch der

[1]) a. a. O., S. 214.

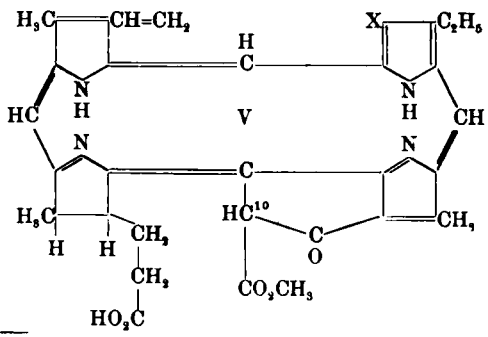
3-Formylgruppe, zu gewinnen. Es zeigte sich jedoch, daß unter diesen Bedingungen, im Gegensatz zur 9-Ketogruppe, die 3-Formylgruppe bereits völlig reduziert wird: Es war nach dem Spektrum Mesopyrophäophorbid **a** entstanden, das sich als Ester nach Schmelz- und Mischschmelzp. (206°) als identisch mit obigem, aus Pyrophäophorbid a erhaltenen, erwies und wie dieser optisch-inaktiv war. Es ist dies somit das zweite von der b-Reihe aus gewonnene a-Chlorin.

Ob unter noch milderen Bedingungen unter Vermeidung eines Angriffs auf die 3-Formylgruppe durch die WK. trotzdem Inaktivierung erreicht, also so auch inaktive Körper der b-Reihe gewonnen werden können, muß noch untersucht werden.

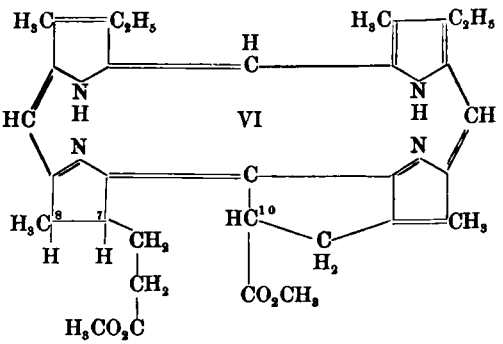
Die bisher berichteten Versuchsergebnisse seien in folgendem Schema zusammengestellt:



Schließlich wurde noch die Einwirkung von 100-proc. Ameisensäure und Palladium auf Phäophorbid (V) untersucht.



[1]) Vgl. Versuchsteil, S. 160.



VI

Erwartungsgemäß entstand aus Phäophorbid a (V, $X = CH_3$), allerdings in geringer Ausbeute, unter Decarboxylierung am Kohlenstoffatom 10 Mesodesoxopyrophäophorbid a (vgl. II), das sich als Ester in seinen Eigenschaften und dem Debye-Scherrer-Diagramm mit aus Pyrophäophorbid erhaltenem aktiven Material als identisch erwies.

Neben sehr viel zerstörtem Material konnte dann noch ein neuer Körper isoliert werden, bei dem es sich um nicht decarboxyliertes Mesodesoxophäophorbid a (VI) handeln dürfte[1]): Es reagiert wie der analoge Pyrokörper nicht mit Jodwasserstoff-Eisessig in der Siedehitze wegen des Fehlens eines negativen Substituenten in 6-Stellung, zeigt deshalb auch ein Chlorin- (und kein Ring-) spektrum[2]); dieses ist gegenüber dem des Pyrokörpers etwas auseinander gezogen, ähnlich wie beim Phäophorbid a im Vergleich zum Pyrophäophorbid a. Der Körper zeigt in Lösung bedeutend geringere Fluorescenz als das Meso-desoxopyrophäophorbid a. Er reagiert nicht mit Hydroxylamin noch mit n-propanolischem Kali, nicht mit Benzoylchlorid, noch mit Pyridin-Soda. Mit konz. Salzsäure im zugeschmolzenen Reagenzglas ergab sich nach 10—20-stündigem Erhitzen auf 100° das Spektrum des Desoxophyllerythrins, ebenso nach 1—2-stündigem Erwärmen in konz. Schwefelsäure auf 90°.

Das durch heiße konz. Schwefelsäure entstehende Porphyrin wurde in geringer Menge isoliert. Es besaß einen Schmelzpunkt von 287°, schmolz also um über 20° höher als Desoxophyllerythrin-methylester (Schmelzp. 264°) und ergab mit diesem gemischt eine Depression auf 250°; es dürfte Desoxophäoporphyrin-a_5-dimethylester[3]) (VI, ohne die H-Atome 7 und 8) vorliegen, dessen Bildung ohne weiteres verständlich erschiene. (Es zeigt sich hier wieder, wie vorsichtig man mit der Auswertung spektraler Befunde allein sein muß!) Die Versuche, die interessante Muttersubstanz, das Mesodesoxophäophorbid a, zu isolieren, werden fortgesetzt.

[1]) Vgl. dazu H. Fischer u. S. Goebel, A. 524, 273 (1936).
[2]) Vgl. H. Fischer u. H. Gibian, a. a. O. S. 211.
[3]) H. Fischer u. E. Stier, A. 542, 230 (1939).

Entsprechende Versuchsansätze mit Phäophorbid b (das allerdings roh, also noch mit geringer Beimischung der a-Komponente verwandt wurde) ergaben das völlig gleiche Bild wie oben. Es konnte wiederum der aktive Meso-desoxopyrophäophorbid a-methylester erhalten werden, wie auch der nach Spektrum und Schmelzpunkt (jeweils 185°, allerdings unscharf) mit obigem gleiche, vermutliche Meso-desoxo-phäophorbid a-dimethylester.

Reduktionsversuche von Purpurin 7-trimethylester, Purpurin 18-methylester und Purpurin 18-methylesterimid ergaben neben viel zerstörtem Material stets nur das Spektrum des jeweiligen Mesokörpers.

Für biologische Versuche wären inaktive Zucker, ebenso inaktive Sterine von großem Interesse. Deshalb wurden Rohrzucker und Cholesterin der WK.-Reaktion bei 100° unterworfen. Die Drehwerte blieben jedoch unvermindert, das Cholesterin wurde in allen Eigenschaften unverändert wieder gewonnen. Unter Anwendung von energischeren Bedingungen sollen die Versuche fortgesetzt werden.

Versuche.

Inaktiver Mesodesoxopyrophäophorbid a-methylester aus Pyrophäophorbid b.

Zur Gewinnung von reinem Ausgangsmaterial wurde Roh-phäophorbid b durch Extraktion aus der Hülse in Aceton gelöst, in Äther gebracht, mit 12—16-proc. HCl die noch beigemengte a-Komponente völlig entfernt (spektroskopische Prüfung der Auszüge!) und mit 25-proc. HCl das Phäophorbid b umfraktioniert. Das so gereinigte Produkt wurde dann wie üblich durch Kochen in Pyridin decarboxyliert.

150 mg Pyrophäophorbid b-methylester wurden in 1 ccm Pyridin mit je 4 ccm Hydrazinhydrat und gesättigter (etwa 10-proc.) Natriummethylatlösung im Bombenrohr 8 Stunden auf 115—120° erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgte wie früher beschrieben[1]). Als Nebenprodukt wurde auch hier Desoxophyllerythrin-methylester vom Schmelzp. 264° isoliert, der mit anderem Material keine Schmelzpunktsdepression ergab, und gleiches Spektrum wie dieses besaß. Umkrystallisiert wurde aus Chloroform-Äther nach Chromatographieren an Aluminiumoxyd aus den gleichen Lösungsmitteln.

3,669 mg Subst. (bei 150° i. Hochv. getr.): 10,234 mg CO_2, 2,357 mg H_2O. — 4,133 mg Subst.: 0,392 ccm N_2 (20°, 719 mm).

$C_{34}H_{38}O_2N_4$ (534,3)	Ber.	C 76,36	H 7,17	N 10,49
	Gef.	„ 76,07	„ 7,19	„ 10,22.

[1]) H. Fischer u. H. Gibian, a. a. O. S. 232.

Das Hauptprodukt besaß nach Chromatographieren an Aluminiumoxyd aus Äther und Umkrystallisieren aus Chloroform-Äther-Ligroin einen Schmelzpunkt von 209—210°, ergab keine Depression gemischt mit anderem inaktiven Mesodesoxopyrophäophorbid a-methylester vom Schmelzp. 211° bis 212° und besaß gleiches Spektrum und gleiches Röntgendiagramm wie dieses.

4,671 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. getr.): 0,449 ccm N_2 (22°, 719 mm). — 3,230 mg Subst.: 0,366 ccm $^n/_{50}$-KSCN.

$C_{34}H_{40}O_2N_4$ (536,3)	Ber.	N 10,44	OCH_3	5,78
	Gef.	„ 10,52	„	7,03.

Drehung des polarisierten Lichtes: in Aceton und in 30-proc. Salzsäure keine meßbaren Werte.

Zum Vergleich aktives Material: bei einer Einwaage von 113,5 mg in 100 ccm 30-proc. Salzsäure:

$(^1/_2$ dm-Rohr), $\Delta\alpha_{rot} = -0{,}64°$; $[\alpha]_{20}^{rot} = -1130°$.

Aktiver Mesodesoxopyrophäophorbid a-methylester aus Pyrophäophorbid b.

In mehreren Ansätzen wurden je 100 mg Pyrophäophorbid b-methylester mit 100 mg methanolfeuchtem Palladium in 4 ccm 100-proc. Ameisensäure $^3/_4$-Stunden unter Rückfluß zum gelinden Sieden erhitzt, nötigenfalls (Spektrum!) zu neuen 20 mg Palladium mit 1—2 ccm Ameisensäure gespült und noch etwa $^1/_2$ Stunde gekocht[1]). Dann wurde in 50 ccm Methanol gegeben, dem etwas konz. Schwefelsäure zugesetzt war, zwecks Veresterung einige Stunden stehen gelassen und danach in Äther überführt. Mit 3-proc. HCl wurde viel zerstörtes Material entzogen, mit 8—10-proc. HCl das Hauptprodukt zusammen mit etwas Phylloerythrin und weiteren Verunreinigungen umfraktioniert. Völlige Reinigung erfolgte dann nach Nachveresterung mit Diazomethan durch Chromatographieren aus Äther an Aluminiumoxyd und Umkrystallisieren aus Chloroform-Äther-Ligroin.

Es treten zwei Krystallarten auf: Stäbchen vom Schmelzpunkt 178° und meist zu Rosetten verwachsene Nadeln vom

[1]) Vgl. auch H. Fischer u. H. Gibian, a. a. O. S. 230.

Schmelzp. 196°. Die beiden Formen gehen während des Umkrystallisierens ineinander über und treten in wechselndem Mengenverhältnis auf. Die gleichen Erscheinungen werden an aus Pyrophäophorbid a und aus Mesopyrophäophorbid a-methylester hergestellten Produkten beobachtet. Beim Schmelzen unter dem Mikroskop (Kofler) zeigte sich, daß auch das alte Lautenschlagersche Präparat[1]) kurz über dem Schmelzpunkt, eventuell nach geringem Abkühlen, teils wieder zu Nadeln rekrystallisierte, die erst etwa 18° höher völlig schmolzen. Besonders bei schon anfänglicher Anwesenheit der höher schmelzenden Form bei anderen Präparaten liefert diese die Krystallisationskeime für die alsbald wieder fast völlig erstarrende Schmelze der niedriger schmelzenden Form. Die Schmelzpunkte der beiden also wohl dimorphen Krystallarten liegen bei allen Präparaten nahezu gleich bei etwa 186° bzw. 204° (Kofler).

In den Röntgendiagrammen waren sämtliche Präparate völlig identisch, ebenso im Spektrum. Im Mischschmelzpunkt traten keine Depressionen ein.

4,523 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. getr.): 0,410 ccm N_2 (22°, 720 mm). — 4,700 mg Subst.: 0,446 ccm $^n/_{50}$-KSCN.

$C_{34}H_{40}O_2N_4$ (536,3) Ber. N 10,44 OCH_3 5,78
Gef. „ 9,94 „ 5,88.

Drehung des polarisierten Lichtes: 17,05 mg Subst. in 100 ccm Aceton.

$$\Delta\alpha_{rot} = -0{,}11° \pm 0{,}02°; \quad [\alpha]_{20}^{rot} = -645° \pm 115°.$$

Zum Vergleich: aus Pyrophäophorbid a hergestelltes Material: 20,0 mg Subst. in 100 ccm Aceton.

$$\Delta\alpha_{rot} = -0{,}11° \pm 0{,}02°; \quad [\alpha]_{20}^{rot} = -550° \pm 100°.$$

Inaktiver Mesophyllochlorinmethylester aus Mesopurpurin 3-methylester.

Etwa 20 mg Mesopurpurin 3-methylester wurden in $^1/_2$ ccm Pyridin und je 2 ccm Hydrazinhydrat und gesättigter Natriummethylatlösung 8 Stunden im Bombenrohr auf 115—120° erhitzt. Es wurde in Äther getrieben und mit 2-proc. HCl etwas Phylloporphyrin (Spektrum!) entzogen, das nach Ver-

[1]) Vgl. auch H. Fischer u. H. Gibian. a. a. O. S. 230.

esterung und chromatographischer Reinigung einen Schmelzpunkt 234° (korr.) besaß [Literaturangabe[1]): 235° korr.].

Mit 10-proc. HCl wurde das Mesophyllochlorin umfraktioniert, das nach Veresterung mit Diazomethan, Chromatographie an Aluminiumoxyd aus Äther und Umkrystallisieren aus Äther-Ligroin nach Schmelz- und Mischschmelzp. (166° bis 167°), Röntgendiagramm und Spektrum mit anderem Material identisch war.

1,740 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. getr.): 4,849 mg CO_2, 1,243 mg H_2O.

$C_{33}H_{40}O_2N_4$ (524,3) Ber. C 75,53 H 7,69 Gef. C 76,00 H 7,99.

Drehung des polarisierten Lichtes: keine außerhalb des Meßfehlerbereiches.

Inaktiver Mesopyrophäophorbid a-methylester
(aus Pyrophäophorbid a).

1. 200 mg Pyrophäophorbid a wurden in 1 ccm Pyridin mit je 4 ccm Hydrazinhydrat und konz. Natriummethylatlösung 8 Stunden im Bombenrohr auf 100° erhitzt. Die Reaktionslösung wurde in etwa 100 ccm 25-proc. Salzsäure gespült und zur Verseifung des gebildeten Hydrazons eine halbe Stunde auf dem kochenden Wasserbad stehen gelassen. Aufgearbeitet wurde wie üblich über Äther: mit 8-proc. HCl wurde eine Vorfraktion von Nebenprodukten (wenig Mesodesoxopyrophäophorbid a), mit 15-proc. HCl die Hauptfraktion genommen. Gelegentlich ist etwas Nachhydrieren mit Wasserstoff-Palladium in Aceton nötig. Nach Verestern wurde aus Äther an Aluminiumoxyd chromatographiert, umkrystallisiert aus Chloroform-Ligroin: Nadeln vom Schmelzp. 205—206°.

2. Ein entsprechender Ansatz wurde am Steigrohr 7 Stunden im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Aufarbeiten und Reinigung wie oben Schmelzp. 205—206°. Gemischt mit aktivem Material vom Schmelzp. 232° ergibt sich ein unscharfer Mischschmelzpunkt von etwa 215—220°.

4,577 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. getr.): 12,427 mg CO_2, 2,932 mg H_2O. — 3,201 mg Subst.: 0,307 ccm N_2 (23°, 715 mm). — 4,843 mg Subst.: 0,456 ccm $^n/_{50}$-KSCN.

$C_{34}H_{38}O_3N_4$ (550,3) Ber. C 74,14 H 6,96 N 10,18 OCH_3 5,64
Gef. „ 74,05 „ 7,17 „ 10,41 „ 5,84.

Optische Drehung (Messung stets im $^1/_2$ dm-Rohr).

[1]) H. Fischer u. H. Orth, Die Chemie des Pyrrols, II/1, S. 359.

88,7 mg Subst. in 100 ccm Aceton: keine meßbare Drehung, auch nicht nach Verdünnung im Verhältnis 1 : 2. 175,9 mg Subst. in 100 ccm 30-proc. Salzsäure: ebenfalls keine meßbare Drehung, auch nicht nach Verdünnung im Verhältnis 1 : 2 und 1 : 3. — Zum Vergleich aktiver Mesopyrophäophorbid a-methylester vom Schmelzp. 232°.

86,7 mg Subst. in 100 ccm Aceton:

$$\Delta\alpha_{rot} = -0{,}17°; \quad [\alpha]^{rot}_{20\,1} = -390°.$$

172,6 mg Subst. in 100 ccm 30-proc. Salzsäure:

$$\Delta\alpha_{rot} = -0{,}81°; \quad [\alpha]^{rot}_{20} = -940°.$$

Verdünnt im Verhältnis 1 : 2:

$$\Delta\alpha_{rot} = -0{,}41°; \quad [\alpha]^{rot}_{20} = -950°.$$

Verdünnt im Verhältnis 1 : 3:

$$\Delta\alpha_{rot} = -0{,}28°; \quad [\alpha]^{rot}_{20} = -970°.$$

Beim Chromatographieren fiel sowohl bei 1. wie bei 2. etwas Mesodesoxopyrophäophorbid a-methylester (Spektrum!) an, der keine meßbare optische Aktivität zeigte, wie anderes inaktives Material bei 210° bis 212° schmolz, und mit diesem gemischt keine Schmelzpunktsdepression ergab.

Bei kurzdauernder Einwirkung von HJ-Eisessig bei 50° auf den inaktiven Mesopyrophäophorbid a-methylester wurde das Spektrum des Phylloerythrins erhalten, mit Hydroxylaminhydrochlorid und Soda in Pyridin das normale Oximspektrum.

Zinkkomplexsalz: Darstellung wie üblich in Chloroform mit methanolischer Zinkacetatlösung. Umkrystallisiert aus Äther, schwer löslich in diesem und in Methanol. Nadeln vom Schmelzp. 158°.

3,291 mg Subst. (bei 120° i. Hochv. getr.): 0,271 ccm N_2 (22°, 715 mm).

$C_{34}H_{36}O_5N_4Zn$ (613,7) Ber. N 9,13 Gef. N 9,00.

Spektrum in Dioxan-Äther: I. $\underbrace{655—633}_{644}$; II. $\underbrace{605—585}_{595}$;

III. ....558...; IV. ...517...; End.-Abs. ~430.

Reihenfolge der Intensitäten: I, II, III, IV.

Drehung des polarisierten Lichtes: in Aceton bei verschiedenen Konzentrationen keine außerhalb des Meßfehlerbereiches liegenden Werte.

Inaktiver Mesopyrophäophorbid a-methylester (aus Pyrophäophorbid b).

100 mg Pyrophäophorbid b-methylester (frei von der a-Komponente) wurden in 1 ccm Pyridin mit je 4 ccm Hydrazinhydrat und konz. Natriummethylatlösung 7 Stunden im Bombenrohr auf 100° erhitzt. Aufgearbeitet wurde wie oben

bei Pyrophäophorbid a beschrieben. Nachhydrieren war nicht nötig. Im Restäther war auch nicht spurenweise das Spektrum eines b-Körpers zu erkennen. (Bei einem kleinen Ansatz, der nur 3 Stunden erhitzt worden war, war nach dem Spektrum die 3-Formylgruppe ebenfalls bereits völlig reduziert worden.) Nach Chromatographie und Umkrystallisieren ergab sich ein Schmelzpunkt von 205—206°. Im Mischschmelzpunkt keine Depression mit obigem Material, Spektrum wie bei diesem.

4,203 mg Subst. (bei 130° i. Hochv. getr.): 11,460 mg CO_2, 2,831 mg H_2O.

$C_{34}H_{38}O_3N_4$ (550,3) Ber. C 74,14 H 6,96 Gef. C 74,26 H 7,52.

Optische Drehung: in Aceton und in 30-proc. Salzsäure keine meßbare optische Aktivität.

Inaktiver Mesodesoxopyrophäophorbid a-methylester aus inaktivem Mesopyrophäophorbid a-methylester.

1. Etwa 30 mg Subst. wurden in 1 ccm Pyridin mit je 1,5 ccm Hydrazinhydrat und konz. Natriummethylatlösung 6 Stunden im Bombenrohr auf 112° erhitzt und wie üblich (vgl. S. 160) aufgearbeitet. Aus Äther-Ligroin feine biegsame Nadeln vom Schmelzp. 211—212°, im Mischschmelzpunkt mit anderem Material keine Depression. Spektrum und Röntgendiagramm wie dieses. Keine meßbare optische Aktivität.

2. Etwa 30 mg Subst. wurden, wie oben (vgl. S. 161) beschrieben, mit 100-proc. Ameisensäure und Palladium reduziert und aufgearbeitet. Nach üblicher Reinigung ergab sich ein Schmelzpunkt von 212°, auch nach allen sonstigen Eigenschaften, z. B. Röntgendiagramm, Identität mit anderem inaktivem Material.

3,703 mg Subst. (bei 100° i. Hochv. getr.): 0,341 ccm N_2 (21°, 720 mm). — 4,008 mg Subst.: 0,416 ccm $^n/_{50}$-KSCN.

$C_{34}H_{40}O_2N_4$ (536,3) Ber. N 10,44 OCH_3 5,78 Gef.: N 10,13 OCH_3 6,44.

Drehung des polarisierten Lichtes: in Aceton und in 30-proc. Salzsäure keine außerhalb der Meßfehlergrenze liegenden Werte.

Zum Vergleich aktives Material: 90,8 mg Subst. in 100 ccm 30-proc. HCl;

$$\Delta\alpha_{rot} = -0{,}51°; \quad [\alpha]_{20}^{rot} = -1120°.$$

22,7 mg Subst. in 100 ccm 30-proc. HCl (gemessen im $^1/_2$ dm-Rohr):

$$\Delta\alpha_{blau} = +0{,}26°; \quad [\alpha]_{20}^{blau} = +2300°.$$

Einwirkung von Ameisensäure-Palladium auf Phäophorbid[1]).

1. Mehrere Ansätze von je 100 mg Phäophorbid a wurden wie oben (vgl. S. 161) mit 100-proc. Ameisensäure und Palladium reduziert und

[1]) Vgl. auch H. Fischer u. S. Goebel, A. 524, 277 (1936).

zusammen aufgearbeitet. Die Hauptfraktion mit 10-proc. HCl wurde in frischen Äther überführt und mit Diazomethan verestert. Beim Einengen krystallisierte etwas Substanz mit Phylloerythrinspektrum aus. Die dekantierte Ätherlösung wurde mehrmals an Aluminiumoxyd chromatographiert. Der Vorlauf (erst bei fortgeschrittener Reinigung treten Zonen auf, daher spektroskopische Kontrolle nötig!) enthielt Meso-desoxo-pyrophäophorbid a-methylester, der größtenteils in Stäbchen vom Schmelzp. 178° (vgl. S. 161) krystallisierte, gleiches Spektrum und gleiches Röntgendiagramm wie Material anderer Darstellung besaß und mit diesem keine Depression im Mischschmelzpunkt ergab.

Aus der chromatographischen Hauptfraktion wurde ein in Drusen krystallisierender Körper erhalten, der auch nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Äther-Ligroin nur unscharf bei 185° schmolz (Spektrum danach unverändert).

Spektrum in Äther:

I. $\underbrace{652—628}_{640}$; II. 612; III. ...585 (max.)...; IV. 541; V. 522;

VI. $\underbrace{504—478}_{491}$; End.-Abs. ~ 430.

Reihenfolge der Intensitäten: I, VI, III bzw. V, II, IV.

Folgende Versuche mit diesem Körper verliefen nach dem spektroskopischen Befund negativ: 1-stündige Einwirkung von Hydroxylamin-hydrochlorid-Soda in Pyridin bei 100°; 2-tägiges Stehen in 20-proc. HCl bei Zimmertemperatur; 3-minütiges Kochen in n-propanolischem Kali; 2-stündiges Erhitzen in Jodwasserstoffsäure-Eisessig bei 100°; 2-tägiges Stehen in Pyridin mit Benzoylchlorid; 10-stündiges Kochen in Pyridin; 1-tägiges Kochen in Pyridin mit Soda. — Das Spektrum des Desoxo-phyllerythrins trat auf in geringem Maße bei 2-tägigem Stehen in konz. Schwefelsäure bei Zimmertemperatur, ausschließlich bei 1—2-stündigem Erwärmen in konz. Schwefelsäure auf 90° und bei 10—20-stündigem Erhitzen in konz. Salzsäure im zugeschmolzenen Reagenzglas auf 100°.

Dehydrierung in konz. Schwefelsäure: Etwa 10 mg Meso-desoxo-phäophorbid a-methylester wurden in 5 ccm konz. Schwefelsäure gelöst und etwa $1^1/_2$ Stunden auf 90° erwärmt, bis reines Porphyrinspektrum zu beobachten war. Nach Abkühlen wurde in 100 ccm Methanol gegossen und zur Veresterung einige Stunden stehen gelassen. Es wurde in Äther gebracht, mit destilliertem Wasser dieser gründlich gewaschen, eingeengt und nach Zusatz von Chloroform an Aluminiumoxyd chromatographiert. Umkrystallisiert wurde aus Chloroform-Äther. Schmelzp. 287°, gemischt mit Desoxophyllerythrinmethylester (Schmelzp. 264°) tritt Schmelzen unscharf ab etwa 250° ein, Spektrum wie bei Desoxophäoporphyrin a_5-dimethylester[1]), praktisch identisch mit dem von Desoxophyllerythrin.

[1]) H. Fischer u. E. Stier, A. 542, 239 (1939).

2. Mehrere Ansätze mit je 100 mg Phäophorbid b (roh, einmal aus Aceton umkrystallisiert, also noch etwas a-Komponente enthaltend) wurden genau wie unter 1. beschrieben aufgearbeitet. Es ergab sich hierbei das völlig gleiche Bild wie dort.

Einwirkung von 100-proc. Ameisensäure-Palladium auf Purpurin 7-trimethylester, Purpurin 18-methylester und Purpurin 18-methylester-imid.

Es wurden jeweils etwa 10 mg Substanz behandelt, wie S. 161 beschrieben. Nach Überführen in Äther war neben viel zerstörtem Material nur das Spektrum des betreffenden Mesokörpers zu beobachten. Bei Purpurin 7 mußte mit methanolischer Ferrichloridlösung reoxydiert werden.

Anwendung der WK.-Reaktion auf Rohrzucker und Cholesterin.

1. 500 mg Rohrzucker wurden mit 1 ccm Pyridin und je 4 ccm Hydrazinhydrat und konz. Natriummethylatlösung im Bombenrohr 8—9 Stunden auf 100° erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde in ein Becherglas gespült, mit etwa 15 ccm 20-proc. HCl nahezu neutralisiert (Lackmus noch schwach blau) und mit destilliertem Wasser auf 50 ccm gebracht.

Drehung (1 dm-Rohr): $\Delta\alpha_{rot} = +\ 0{,}43° \pm 0{,}03°$.

Zum Vergleich wurde ein entsprechender Ansatz wie oben bereitet, jedoch *nicht* erhitzt.

Drehung: $\Delta\alpha_{rot} = +\ 0{,}46° \pm 0{,}03°$.

2. 100 mg Cholesterin wurden in 1 ccm Pyridin mit je 4 ccm Hydrazinhydrat und konz. Natriummethylatlösung im Bombenrohr 8 bis 9 Stunden auf 100° erhitzt. Die Reaktionslösung wurde nach Ansäuern mit Salzsäure mit Äther mehrmals ausgeschüttelt, dieser mit 2-proc. HCl und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Nach Zusatz von Methanol erfolgte Krystallisation. Umkrystallisiert wurde aus Äther-Methanol: Nadeln vom Schmelzp. 147°, keine Depression mit dem Ausgangsmaterial vom Schmelzp. 148°. Farbreaktionen mit konz. Schwefelsäure und Essigsäureanhydrid + konz. Schwefelsäure wie beim Ausgangskörper.

Drehung des polarisierten Lichtes: 172 mg Subst. in 100 ccm Aceton:

$\Delta\alpha_{rot} = -\ 0{,}05° \pm 0{,}01°$ (1 dm-Rohr); $[\alpha]^{rot}_{20} = -\ 29° \pm 6°$.

Zum Vergleich Ausgangsmaterial: 220 mg Subst. in 100 ccm Aceton:

$\Delta\alpha_{rot} = -\ 0{,}07° \pm 0{,}01°$; $[\alpha]^{rot}_{20} = -\ 32° \pm 5°$.

Zur Kenntnis der baktericiden Wirkung. I.

Über das Desinfektionsvermögen der Alkohole in nichtwäßrigen Lösungsmitteln;

von *Günther Endres* und *Ellen Rohr**).

[Aus dem Chemischen Staatsinstitut der Universität Hamburg.]

(Eingelaufen am 4. Juni 1942.)

Das wichtigste Ergebnis der Untersuchungen von E. Overton[1]) über die Narkose ist die Feststellung, daß die narkotische Kraft einer Verbindung in erster Linie durch die Größe ihres Teilungskoeffizienten zwischen Wasser und Plasmalipoiden bestimmt wird. Im Einklang hiermit konnte H. H. Meyer[2]) zeigen, daß bei Temperaturänderungen eine gleichsinnige Verschiebung der narkotischen Grenzkonzentration mit dem Teilungskoeffizienten erfolgt.

Da bekanntlich zwischen Narkotica und Antiseptica manche Übergänge bestehen, oft die Einordnung einer Substanz in die eine oder andere Gruppe nur eine Konzentrationsfrage darstellt, zeigen häufig auch Lipoidlöslichkeit und Keimtötungsvermögen einen parallelen Gang. Dieser läßt in homologen Reihen, beispielsweise bei den ersten Gliedern der aliphatischen Alkohole, die Desinfektionskraft als eine Funktion des Verteilungsquotienten zwischen Wasser und Lipoiden erscheinen.

Hailer[3]) hat als erster darauf hingewiesen, daß eine durch die Anreicherung von desinfizierenden Substanzen in den Zelllipoiden eingetretene Gleichgewichtsstörung nur eine entwicklungshemmende Wirkung verständlich erscheinen läßt, da

*) Zum 4. Juni 1942, dem 65. Geburtstag von H. Wieland, sei es dem einen von uns (G. Endres) auch an dieser Stelle gestattet, seine herzlichen Glückwünsche und Gefühle großer Dankbarkeit aussprechen zu dürfen.

[1]) Overton, Studien über Narkose. Jena 1901.

[2]) H. H. Meyer, Schm. A. 42, 109 (1899).

[3]) Weyls Handbuch der Hygiene. Bd. VIII. S. 891. 1922.

nur dieser Effekt analog dem narkotischen reversibel ist. Für den irreversiblen Prozeß der Keimvernichtung jedoch kann die Aufnahme von Fremdkörpern in die lipoide Phase nicht die unmittelbare Ursache, wohl aber eine der Vorbedingungen darstellen.

In der Absicht, weitere Einblicke in den Mechanismus der baktericiden Wirkung, insbesondere über die Bedeutung der Overtonschen Theorie für Desinfektionsmittel, zu gewinnen, haben wir eine Untersuchung über das Keimtötungsvermögen von Alkoholen in nichtwäßrigen Lösungsmitteln durchgeführt. Angeregt wurde die Arbeit durch die Beobachtung, daß Gemische von absolutem Äthylalkohol und Benzin auf vegetative Formen merkwürdigerweise zellvernichtend wirken, während die einzelnen Komponenten, also die reinen Lösungsmittel, keine Wirkung zeigen.

I.

Die bisherigen Arbeiten über die baktericide Kraft der aliphatischen Alkohole — ein Thema, das von sehr vielen Seiten im Hinblick auf seine praktische Bedeutung bearbeitet worden ist — haben ausschließlich die Prüfung des Desinfektionsvermögens von Wasser-Alkoholgemischen zum Inhalt. In der Tab. 1 ist das Ergebnis derartiger Versuchsansätze zusammengestellt, die wir, um einen Vergleich mit den Verhältnissen in nichtwäßrigen Lösungsmitteln zu haben, durchführten.

Als Testbakterien dienten stets 24 Stunden alte, dicht bewachsene Kulturen von Staphylococcus aureus und Bact. Coli. Als Keimträger wurden etwa $^3/_4$ qcm große Batistläppchen benutzt. Diese wurden mit einer konz. Suspension, die durch Abschwämmen eines Schrägagar-Röhrchens mit etwa 15 ccm destilliertem Wasser gewonnen war, 15 Minuten lang getränkt und alsdann unter sterilen Kautelen während etwa 4 Stunden bei 37° getrocknet. Für die Versuchsansätze wurden die trocknen Keimträger auf Glasschalen verteilt, mit dem zu prüfenden Lösungsmittelgemisch übergossen, nach den gewählten Zeiten entnommen, auf sterilem Fließpapier abgetupft und in 2 Proc. Traubenzucker-Bouillon gegeben. Die Ablesung erfolgte nach 4 Tagen Bebrütung. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte von mindestens 4 Versuchsreihen dar. Für die Einwirkungszeiten und die Alkoholkonzentrationen wurden absichtlich relativ große Stufen gewählt, da es *nur* auf die Feststellungen des dominierenden Ganges unter vergleichbaren Bedingungen ankam.

Tabelle 1.

Baktericide Wirkung wasserhaltiger Alkohole auf Staph. aureus und Bact. Coli.

− = Abtötung + = Wachstum

Einwirkungszeit		Staph.							Coli						
		20	30	40	50	60	80	100	20	30	40	50	60	80	100
Methylalkohol	120′	+	+	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−
	60′	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−
	30′	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−
	10′	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−
Äthylalkohol	120′	+	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−
	60′	+	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−
	30′	+	+	+	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−
	10′	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	−	−	+
Propylalkohol	120′	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
	60′	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
	30′	+	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+
	10′	+	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+
		20	30	40	50	60	80	100	20	30	40	50	60	80	100
		Vol.-Proc. Alkohol													

Die Ursache für die Keimvernichtung durch die Alkohole beruht sicherlich auf einer irreversiblen, kaum auswählenden Koagulation des Plasma-Eiweißes in der Zelle. Hierfür spricht vor allem die Tatsache, daß die Bakterien nur durch einen relativ sehr hohen Alkoholgehalt abgetötet werden, durch einen Gehalt, der — verglichen mit den Grenzkonzentrationen anderer desinfizierender Substanzen — um mehrere Zehnerpotenzen größer ist. Weiterhin wird diese Vorstellung durch den symbaten Verlauf von desinfizierender Wirkung und Fällungsvermögen in vitro gegen Serumalbumine bzw. Nucleoproteide in der Reihe Methyl-Äthyl-Propylalkohol gestützt[1]).

Aus der Tab. 1 geht hervor, daß die baktericide Kraft mit steigendem Molekulargewicht des Alkohols zunimmt, d. h. der wirksame Konzentrationsbereich sich vergrößert. Da in Gegenwart von Wasser die jeweiligen Alkohol-Konzentrationen in der äußeren umgebenden und in der Zell-Flüssigkeit sicherlich in erster Annäherung übereinstimmen, läßt auch aus den Ergebnissen schließen, daß ein Methylalkohol-Spiegel in der

[1]) Batelli u. Stern, Bio. Z. 52, 226 (1913).

Zelle von etwa 50 Vol.-Proc. eine keimvernichtende Koagulation der wäßrigen kolloidalen Zell-Eiweißlösung bewirkt. Die entsprechenden Grenzzahlen bei Äthyl- und Propylalkohol liegen, um einen ungefähren zahlenmäßigen Anhaltspunkt zu geben, bei etwa 40 und 30 Vol.-Proc. Alkohol. Für Bact. Coli, das etwas weniger widerstandsfähig, d. h. empfindlicher gegen die Fällungswirkung der Alkohole ist, werden ähnliche Abstufungen erhalten.

Absoluter Methylalkohol wirkt bei einer Einwirkungszeit von über 10 Minuten auf Staph. pyog. aureus, der am Batistläppchen angetrocknet ist, keimtötend. Ohne Wirkung bleibt der Äthyl- und Propylalkohol in wasserfreiem Zustande. Diese Befunde stehen in Einklang mit den Ergebnissen einer jüngst erschienenen Arbeit von G. Lockemann, F. Bär und W. Totzeck[1]).

II.

Ein ganz anderes bakteriologisches Bild ergibt sich, wenn die Alkohole anstatt mit Wasser mit inerten Lösungsmitteln — beispielsweise Benzin oder Tetrachlorkohlenstoff — verdünnt werden. In diesem Falle nimmt die baktericide Wirkung mit steigendem Mol.-Gew. der Alkohole ab. Die Verhältnisse liegen hier gerade umgekehrt wie bei den Wasser-Alkoholgemischen. Dieser Befund ist überraschend, da die spezifische Giftwirkung, deren Maß durch die noch eben wirksame Alkohol-Konzentration in der Zelle gegeben ist, vom Methyl- zum Propylalkohol ansteigt.

Methylalkohol tötet Bact. Coli in einer Konzentration von 0,5—1 Vol.-Proc. sicher während 60 Minuten Einwirkungszeit ab. Äthylalkohol wirkt in Benzin in einer 2-proc., Propylalkohol in Benzin gelöst in einer 20—40-proc. Lösung keimvernichtend. Butylalkohol, der von den untersuchten Alkoholen die größte Lipoidlöslichkeit besitzt, zeigt in Benzin in den geprüften Zeiten kaum mehr eine Wirksamkeit. In den

[1]) Z. Bakt. I. Abt. 147, 1—15 (1941). In dieser Arbeit sind auch Versuche mit Alkohol-Benzin ausgeführt, welche die Autoren auf Grund einer Patentanmeldung von uns durchgeführt haben, und die unsere experimentellen Ergebnisse in den wesentlichen Punkten bestätigen.

Tetrachlorkohlenstoff-Alkohol-Mischungen liegen die wirksamen Grenz-Konzentrationen der Alkohole alle etwas tiefer, was besonders deutlich beim Butylalkohol in Erscheinung tritt. Benzin und Tetrachlorkohlenstoff sind wirkungslos.

Tabelle 2.

Baktericide Wirkung alkoholhaltiger Benzin- oder Tetrachlorkohlenstofflösungen auf Bact. Coli.

		a) Benzin											b) Tetrachlorkohlenstoff										
		0	0,5	1	2	5	10	20	40	60	80	100	0	0,5	1	2	5	10	20	40	60	80	100
Methylalkohol	120′	+	−	−	−	−					−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	60′	+	−	−	−	−					−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	30′	+	+	−	−	−					−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	10′	+	+	−	−	−					−	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
					0	0																		
Äthylalkohol	120′	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−			−	−	−	−	−	−	−
	60′	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−			−	−	−	−	−	−	−
	30′	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−			−	−	−	−	−	−	−
	10′	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−			−	−	−	−	−	−	+
				0	0	0	0							0	0									
Propylalkohol	120′	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	60′	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	30′	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+
	10′	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+
Butylalkohol	120′	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	60′	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+
	30′	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+	+
	10′	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+
		0	0,5	1	2	5	10	20	40	60	80	100	0	0,5	1	2	5	10	20	40	60	80	100

Vol.-Proc. Alkohol

0 = Ansätze mit Zusatz von 5 Proc. Butylalkohol, um Zweischichtenbildung (Mischungslücken) zu vermeiden.

Offenbar nimmt die Wirkung der Alkohole in Benzin bzw. Tetrachlorkohlenstoff mit steigender Kohlenstoffzahl rasch ab, weil der für die Ausfällung der Plasmakolloide notwendige Alkohol-Spiegel in der Zelle um so schwerer erreicht wird, je höher das Mol.-Gew. des Alkohols ist. Zur Deutung dieser Erscheinung wurde eine Untersuchung über die Verteilungsverhältnisse[1]) der Alkohole in Wasser bzw. organischen

[1]) Auf deren Bedeutung zuerst Wolffhügel und v. Knorre hingewiesen haben. Mitt. a. d. KGA I, 352 (1881).

Lösungsmitteln durchgeführt. Es ergaben orientierende Modellversuche an dem System Alkohol-Tetrachlorkohlenstoff-Wasser, daß in der wäßrigen Phase um so mehr Alkohol vorhanden ist, je kleiner dessen Kohlenstoffzahl ist.

Tabelle 3.

Tetrachlorkohlenstoff ccm .	18		18		18		18	
Methylalkohol ccm	2		—		—		—	
Äthylalkohol ccm	—		2		—		—	
Propylalkohol ccm	—		—		2		—	
Butylalkohol ccm.	—		—		—		2	
Wasser zugegeben ccm . .	0,2	2,0	0,2	2,0	0,2	2,0	0,2	2,0
Volumen der nicht-wäßrigen Schicht ccm. .	18,8	18,2	19,6	18,8	20,1	20,0	20,1	20,1

Durch Zugabe von 0,2 ccm Wasser zu 20 ccm einer 10-proc. alkoholischen Tetrachlorkohlenstoff-Lösung sinkt nach mehrmaligem, kräftigem Schütteln das Volumen der nichtwäßrigen Schicht bei Verwendung von Methylalkohol auf 18,8 ccm, während das Volumen der wasserhaltigen Lösung auf etwa 1,4 ccm ansteigt. Es treten also etwa 1,2 ccm Methylalkohol (auch Spuren von Tetrachlorkohlenstoff) in die wäßrige Schicht über, die alsdann aus etwa 80 Proc. Methylalkohol besteht. Bei den Äthylalkohol-Ansätzen geht wesentlich weniger in die wäßrige Phase über. Bei Propyl- und Butylalkohol hat der Vorgang ein umgekehrtes Vorzeichen, da sehr kleine Mengen Wasser von der alkoholischen Tetrachlorkohlenstoff-Lösung aufgenommen werden. Ähnliche Verhältnisse liegen vor, wie die Spalte b) der Tab. 2 zeigt, wenn die Zugabe von Wasser auf 2 ccm erhöht wird. Die Versuche lassen erkennen, daß der Verteilungsquotient:

$$\frac{\text{„Alkohol-Konz. in } CCl_4}{\text{Alkohol-Konz. in } H_2O\text{“}}$$

vom Methyl- zum Butylalkohol stark ansteigt.

Sind die Bakterien wie in den Ansätzen der Tab. 2 von einer alkoholischen Tetrachlorkohlenstoff-Lösung umgeben, so wird auf Grund der gefundenen Verteilungsverhältnisse die Methylalkohol-Konzentration in dem wäßrigen Protoplasma

der Zellen am größten, die Butylalkohol-Konzentration am kleinsten sein. Es muß demzufolge die baktericide Wirkung vom Methyl- zum Butylalkohol abnehmen, eine Aussage, die mit den bakteriologischen Ergebnissen in Einklang steht.

III.

Auf Gram-positive Keime wirken Zusätze der absoluten Alkohole zu Benzin und Tetrachlorkohlenstoff in ähnlicher Weise. Während für Methylalkohol ein Gehalt von 1—2 Proc., für Äthylalkohol ein Gehalt von 5 Proc. ausreicht, um die infizierten Batistläppchen zu entkeimen, ist es mit Propyl- oder Butylalkohol bei einer Einwirkungszeit von 2 Stunden nicht mehr möglich, Staph. aureus abzutöten.

Tabelle 4.

Baktericide Wirkung alkoholhaltiger Benzin- oder Tetrachlorkohlenstofflösungen auf Staph. pyog. aureus.

		Benzin											Tetrachlorkohlenstoff										
		0	0,5	1	2	5	10	20	40	60	80	100	0	0,5	1	2	5	10	20	40	60	80	100
Methylalkohol	120′	+	−	−	−	−					−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
	60′	+	+	−	−	−					−	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
	30′	+	+	−	−	−					−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−
	10′	+	+	−	−	−					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+
					0	0																		
Äthylalkohol	120′	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+
	60′	+	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+
	30′	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+
	10′	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+
				0	0	0	0								0	0	0	0						
Propylalkohol	120′	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	60′	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30′	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10′	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Butylalkohol	120′	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	60′	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30′	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10′	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		0	0,5	1	2	5	10	20	40	60	80	100	0	0,5	1	2	5	10	20	40	60	80	100
		Vol.-Proc. Alkohol											Vol.-Proc. Alkohol										

0 = Ansätze mit Zusatz von 5 Proc. Butylalkohol.

Was aus den Ergebnissen der Coli-Versuche nur andeutungsweise zu erkennen war, tritt bei den Ansätzen mit Staph. deutlich in Erscheinung: Mit steigendem Äthylalkohol-Gehalt des Benzins bzw. Tetrachlorkohlenstoffes nimmt die Desinfektionskraft zuerst zu und dann wieder ab, um bei einem Gehalt von 100 Proc. — genau wie bei 1—2 Proc. — Null zu werden. Im Gebiet der niederen Alkohol-Konzentration ist das Versagen ohne weiteres verständlich. Die absolute Höhe des Desinfiziens reicht unter Berücksichtigung des Verteilungsquotienten nicht aus, um die zur Abtötung notwendige Konzentration in der Zelle zu erreichen. Für die fehlende Wirksamkeit im Bereich der hohen Äthylalkohol-Konzentrationen kann jedoch diese Erklärung nicht gelten. Hier liegt eine andere Ursache vor, die die Ausbildung eines genügend großen Alkoholspiegels in den Bakterien verhindert. Offensichtlich liegt eine Störung der Permeabilität der Zellhaut vor, die dadurch zustande kommt, daß der Äthylalkohol die Poren verschließt und somit sich selbst den Zugang in das Zellinnere verwehrt. Da nach den Untersuchungen von Overton, Degkwitz, Watermann und anderen die äußere Plasmahaut aus einem Gemisch von Eiweiß und Lipoiden besteht, ist anzunehmen, daß die konzentrierten alkoholischen Benzinlösungen eine starke Entquellung, vielleicht auch eine Koagulation des Ektoplasmaeiweißes verursachen, wodurch die Durchlässigkeit der Zellgrenzschicht herabgesetzt oder unterdrückt und gleichzeitig das Permeieren mit Hilfe der Lipoide ausgeschaltet wird. Eine experimentelle Stütze für diese Vorstellung bildet der Befund, daß die Desinfektionskraft *konzentrierter* Lösungen von Methyl-Äthyl-Propylalkohol in Benzin, wie die Tab. 4 zeigt, in dieser Reihenfolge abnimmt, d. h. die Unwirksamkeit dieser Lösungen parallel dem Fällungsvermögen gegen Eiweiß verläuft. Allein der Methylakohol, der die geringste eiweißfällende Wirkung besitzt, ist gegen Staph. aureus selbst in unverdünnter Form voll wirksam, weil er noch in das Zellinnere zu permeieren vermag.

In den Staph.-Versuchen mit Tetrachlorkohlenstoff als Verdünnungsmittel ist der Methylalkohol relativ unwirksam, denn erst in einer 40-proc. Lösung läßt sich in 60 Minuten eine

Entkeimung der Batistläppchen erreichen. Eine Erklärung für dieses anormale Verhalten, das in Benzin nicht zu beobachten ist, vermögen wir nicht zu geben.

IV.

Wie die vorliegenden Ergebnisse andeuten, ist die baktericide Wirkung der Alkohole ein Vorgang komplexer Natur. Die Ursache des Zelltodes ist durch das Eiweißfällungsvermögen der Alkohole gegeben, durch ihre Giftwirkung, die als konstante Größe, definiert durch die noch wirksame Minimalkonzentration in der Zelle, in Erscheinung tritt. Als zweiter, variabler Faktor ist für den Prozeß der Keimvernichtung die jeweilige Konzentration der Alkohole in der wäßrigen Plasmalösung, mit anderen Worten der Desinfiziensspiegel, von besonderer Bedeutung. Er ist weitgehend von den Versuchsbedingungen abhängig und wird vor allem von dem Verteilungsquotienten zwischen Außen- und Zellflüssigkeit bestimmt. Ferner sind auf die Ausbildung des Alkoholgehaltes im Plasma, wie die Versuche lehren, die Permeabilitätsverhältnisse der Zellhaut bzw. die Diffusionsgeschwindigkeit, die Einwirkungszeit und die Temperatur von Einfluß.

Wir sind der Ansicht, daß die für die Alkohole zutreffende Aussage, nämlich, daß die chemischen Reaktionen, welche zur Keimvernichtung führen, sich nicht in der lipoiden, sondern in der wäßrigen Phase im Zellinnern abspielen, allgemeine Gültigkeit hat. Die Overtonsche Theorie scheint uns nicht auf die Wirkungsweise der Desinfektionsmittel übertragbar zu sein, da die baktericide Wirkung — im Gegensatz zur narkotischen — *nicht* durch die Konzentration der wirksamen Substanz in den Plasmalipoiden bestimmt wird. Wir betrachten es als weitere Aufgabe, unsere Vorstellung über den Mechanismus der baktericiden Wirkung an Hand anderer Desinfektionsmittel zu prüfen und insbesondere die spezifische Giftwirkung einer näheren chemischen Deutung zuzuführen.

Über die Verwertbarkeit verschiedener Substrate für die Zellatmung*);

von *Margarete Bülow.*

[Aus dem Laboratorium der Troponwerke Köln-Mülheim.]

(Eingelaufen am 4. Juni 1942.)

Im Gegensatz zu den Vorgängen der Anaerobiose wissen wir über den oxydativen Abbau der Zellen heute noch recht wenig. Das gilt nicht nur für den Abbau von Eiweiß- und Fettsubstanzen, sondern auch für die als Hauptsubstrat in Frage kommenden Kohlehydrate. Der Zusammenhang zwischen Atmung und Gärung, der als Pasteur-Meyerhof-Reaktion bekannt ist, hat allerdings zur Vorstellung eines für die ersten Stufen einheitlichen Abbauweges bei beiden Vorgängen geführt[1]). Mag man nun mit Meyerhof annehmen, daß durch Gärung entstandene Milchsäure zum Teil durch den Sauerstoff der Atmung oxydiert, zum Teil zu Glycogen resynthetisiert wird, oder mit Szent Györgyi eine Umschaltung auf der Stufe der Brenztraubensäure, immer sind es aus dem anaeroben Zuckerabbau bekannte Zwischenstufen, die als Angriffspunkt des oxydativen Abbaus gelten. Diese Annahme gründet sich nur auf Versuche am Muskel. Da man aber bei anderen Geweben sogar für die Glycolyse einen zweiten nicht dem Embden-Meyerhof-Schema folgenden phosphorfreien Abbauweg diskutiert, sind die Stimmen nicht still geworden, die wenigstens hier auch für die Vorgänge in Sauerstoff andersartige Zwischenprodukte proklamieren. Einen Anhaltspunkt dafür geben Versuche mit für die phosphorylierende Glycolyse typischen Giften wie Jodacetat, die einst Lundsgaard[2]) mit

*) Herrn Geh.-Rat Wieland zum 65. Geburtstag.

[1]) C. Oppenheimer, „Die Fermente und ihre Wirkungen". Supplementbd. II, 1448 (1939).

[2]) Bio. Z. 220, 1 u. 8 (1930); 227, 51 (1930).

Kaltblütergewebe anstellte, und die neuerdings Barker[1]) für Warmblüter wiederholt hat. Man kann nach ihnen trotz andersartiger Angaben von Krebs[2]) Bedingungen finden, bei denen die Glycolyse völlig gehemmt ist, die Atmung aber ganz unverändert ist, und so die Trennung beider Vorgänge erreichen.

Was die Untersuchungen der Oxydationsvorgänge gegenüber der Glycolyse sehr erschwert, ist der Umstand, daß jedes lebende Gewebe über einen Vorrat von Eigensubstrat verfügt, der ihm erlaubt, die Atmung auch ohne Substratzusatz im in-vitro-Versuch über Stunden aufrecht zu erhalten. Man kann darum mit reinen Gasstoffwechselmessungen, wie sie häufig gemacht worden sind, wenig anfangen. Es fragt sich immer, ob die im Versuch verschwundene Menge Sauerstoff wirklich Aussagen über die Ausnutzung zugesetzter Stoffe erlaubt, oder ob man nicht wie Holmes und Ashford[3]) bei Gehirn die Eigenatmung von der Gesamtatmung abziehen, und so nur mit dem sogenannten Extrasauerstoff rechnen soll. Das gleiche gilt für die Wirksamkeit der Gifte. Eine ungehemmte Atmung kann ebensogut Abbau des zugesetzten Substrats wie eine einfache Umschaltung auf die (durch Giftwirkung nicht hemmbare) Eigenatmung bedeuten. Bei den meisten Geweben gelingt es weder durch wiederholtes Auswaschen noch Ausdehnen der Versuche auf längere Zeiten das zelleigene Substrat zu entfernen, so daß unter allen Versuchsbedingungen die Atmungsgröße konstant bleibt. Dem gegenüber ist die Glycolyse der meisten Gewebe ohne Substrat außerordentlich gering. Sie fällt z. B. bei Tumor, Gehirn und Darmschleimhaut sehr schnell auf Null ab, und nur für Hühnerembryonen geben Needham und Nowinski[4]) bis zum Alter von 6 Tagen eine deutliche Eigenglycolyse an. Während also im allgemeinen hier die gemessene Kohlensäureentwicklung bzw. die Milchsäurebildung wirklich dem Umsatz der zugesetzten Substrate entspricht, können bei der Atmung nur chemische Bestimmungen etwas

[1]) J. biol. Chem. **129**, 33 (1939).
[2]) Bio. Z. **234**, 278 (1931).
[3]) Bio. J. **24**, 1119 (1930).
[4]) Bio. J. **31**, 1165 (1937).

über die stattfindenden Vorgänge aussagen. Da sich außerdem auch noch überall Besonderheiten der einzelnen Gewebe zeigen, die es gewagt erscheinen lassen, von dem Verhalten eines Gewebes auf das eines anderen zu schließen, dürfte eine Erweiterung des Versuchsmaterials unter Berücksichtigung all dieser Umstände wertvoll sein.

Als Versuchsmaterial bei unseren Versuchen haben wir möglichst die vier Gewebe herangezogen, bei denen eine Glycolyse ohne Phosphorylierung angenommen wird, Jensen-Sarkom, Embryonalgewebe, Gehirn und Darmschleimhaut, und bei diesen Geweben zuerst einmal die bei ihnen vorhandene Eigenatmung bestimmt. Daß Tumor und Embryonen über längere Zeit einen starken Sauerstoffverbrauch auch ohne Gegenwart von Substrat zeigen, geht schon aus Versuchen von Warburg[1]) und Needham[2]) hervor. Wir konnten noch in der 4. Stunde etwa 70 Proc. des Anfangswertes messen. Ähnliches gilt für die Darmschleimhaut. Nur die Atmung des Gehirns bildet eine Ausnahme. Sie ist nach Holmes[3]) schon in der 2. Stunde etwa um ein Drittel und mehr gesunken.

Der respiratorische Quotient der Eigenatmung liegt tief bei den meisten Geweben und spricht für eine Verbrennung von Fett oder Eiweiß. Wir haben für Darmschleimhaut 0,7 bis 0,8 gemessen, für Jensen-Sarkom 0,6—0,8 (Elliott[4]) gibt für Ph-Sa 0,77—0,93, für Walker-Ca 0,80—0,86 an), für den Gewebebrei aus Hühnerembryonen im Alter von 5—11 Tagen 0,6—0,9 (nach Needham[2]) 0,74—0,76). Nur das Gehirn mit einem respiratorischen Quotient um 1 herum, den Ashford und Holmes[5]) und Elliott[4]) angeben, und den auch wir bestätigen konnten, scheint Kohlehydrate zu verbrennen. Um glycolysierbare Kohlehydrate kann es sich aber, wie die Bestimmung der Glycolyse ohne Substratzusatz zeigt, nirgends handeln. Die Beobachtung von Warburg[1]) bei Tumoren und von Dickens und Greville[6]) bei Embryonalgewebe, Gehirn und Sarkom, daß ohne Substrat eine erhöhte Ammoniak-

[1]) O. Warburg, K. Posener u. E. Negelein, Bio. Z. 152, 309 (1924). [2]) Vgl. S. 176, Anm. 3.
[3]) Bio. J. 24, 914 (1930). [4]) Bio. J. 29, 2433 (1935).
[5]) Bio. J. 25, 2028 (1931). [6]) Bio. J. 27, 1123 (1933).

bildung stattfindet, die durch Zusatz von Glucose herabzusetzen ist, wird von ihnen im Sinne einer Eiweißverbrennung gedeutet. Unsere Hemmungsversuche mit für den Zuckerabbau typischen Giften sprechen aber eher gegen diese Annahme, denn die Eigenatmung ist jeweils im gleichen Maße empfindlich gegen Blausäure und Jodacetat wie die Atmung der entsprechenden Gewebe mit Glucose als Substrat (vgl. Tab. 4—6). Nur Natriumfluorid bringt insofern eine gewisse Differenzierung, als es die Eigenatmung von Embryonalgewebe nicht, die von Darmschleimhaut in der Mehrzahl der Fälle ebenfalls nicht beeinflußt, während die Atmung bei Gehirn meist, bei Tumor immer durch Fluorid gehemmt wird. Man müßte aber erst etwas mehr über die Wirkung der verschiedenen Gifte auf die Einzelstufen der Eiweiß- und Fettverbrennung wissen, um diese Beobachtungen richtig zu deuten.

Über die Wirksamkeit des Zusatzes verschiedener Substrate auf die Atmung liegen in der Literatur zahlreiche Versuche vor[1]). Glucose, Milchsäure und Brenztraubensäure erhöhen die Anfangswerte für die Sauerstoffaufnahme bei allen Geweben etwas (von 0—20 Proc.), vor allem aber verhindern sie das Absinken der Atmung mit der Zeit. Bei Tumor fanden wir mit Milchsäure als Substrat die Sauerstoffaufnahme noch in der 4. Stunde gleich hoch wie am Anfang, ebenso bei Embryonalgewebe mit Glucose. Die Gehirnatmung wiederum ist mit allen drei Substanzen in der 2. Stunde 70—90 Proc. des Anfangswertes. Einen Unterschied in bezug auf das Verhalten der drei Substrate kann man bei einer reinen Messung der Sauerstoffaufnahme nicht feststellen. Soweit bestätigen unsere Ergebnisse die früherer Autoren. Es zeigen sich aber bei der chemischen Bestimmung des Verbrauches der Substrate starke Differenzen, die in den beifolgenden Tabellen festgelegt sind[2]).

Glucose verschwindet aus der Versuchslösung bei allen Geweben in starkem Maße (Tab. 1).

---

[1]) C. Oppenheimer, „Die Fermente u. ihre Wirkungen". Hauptteil 2/XVIII.

[2]) Wir geben in den Tabellen aus Raumersparnis nur einige typische Beispiele wieder.

Tabelle 1.

Glucoseoxydation der Gewebe.

Gewebe	mg Glucose Anfangswert	mg Glucose Endwert	mg Glucose verbraucht	Äquivalent des Gesamtsauerstoffs in mg Glucose	Äquivalent des Extrasauerstoffs in mg Glucose	mg Milchsäure gebildet	mg Glucose oxydiert
Darmschleimhaut	7,2	5,1	2,1	2,6	0	0	2,1
Darmschleimhaut	7,6	5,8	1,8	2,2	0,7	0	1,8
Gehirn (Ratte)	7,6	5,5	2,1	2,5	1,1	0	2,1
Gehirn (Kaninchen)	7,4	4,0	3,4	3,6	—	0	3,4
Hühnerembryo (5 Tage)	8,0	7,6	0,4	1,6	—	—	—
Hühnerembryo (9 Tage)	7,6	6,5	1,1	2,7	—	—	—
Jensen-Sarkom	18,0	13,9	4,1	1,8	0,3	2,1	2,0
Jensen-Sarkom	10,8	8,0	2,8	1,3	0,2	2,0	0,8

Die Werte der Tabelle beziehen sich auf Messungen von meist 2 Stunden, nur bei Tumor und Embryonalgewebe wurde bisweilen länger (bis zu 4 Stunden) gemessen, um einen genügend großen Umsatz zu erreichen. — Wir haben es unterlassen, unsere Werte auf die gleichen Gewebemengen umzurechnen, um nicht unnötige Fehler hereinzubringen. Sie sind also nicht unmittelbar miteinander vergleichbar. Dasselbe gilt für die beiden folgenden Tabellen.

Die gleichzeitig gemessene Sauerstoffaufnahme entspricht dabei bei Darmschleimhaut und Gehirn vollkommen der zur völligen Oxydation nötigen Menge Sauerstoff. Allerdings muß man mit der Gesamtatmung rechnen und nicht mit dem sogenannten Extrasauerstoff von Holmes[1]). Bei Hühnerembryonen ist die Atmung oft beträchtlich größer als der Zuckerschwund, obwohl auch hier der Extrasauerstoff nicht groß ist. Dies spricht für die Verwertung noch eines anderen Substrates neben Kohlehydrat und würde Needhams Angaben[1]) bestätigen, daß die reine Kohlenhydratatmung im späteren embryonalen Leben durch Eiweißverwertung und durch Fettverbrennung abgelöst wird. Bei den Tumoren kommt in diesen Versuchen natürlich der Zuckerverbrauch durch aerobe Glycolyse komplizierend hinzu, über den eine gleichzeitige Milchsäurebestimmung orientiert. Allerdings bedeutet das eine neue Fehlerquelle, da bei Tumor die Gleich-

[1]) Vgl. S. 177, Anm. 3.

wertigkeit des Gewebes besonders schwer zu gewährleisten ist. Unter Berücksichtigung dieses Umstandes lassen sich aber auch hier die Versuche im Sinne einer totalen Glucoseverbrennung deuten. Der durchschnittliche oxydative Umsatz von Glucose errechnet sich auf 100 mg Trockengewebe und 1 Stunde (aus Zweistundenwerten berechnet) 2,3 mg für Darmschleimhaut, 1,9 mg für Gehirn, 0,5 mg für Embryo und 1,7 mg für Sarkom. Der respiratorische Quotient steigt in den ersten drei Fällen auf 1. Über seine Größe bei Tumoren etwas auszusagen, ist bei der von uns ausgeführten Methodik nicht möglich. In der Literatur sind die Stimmen darüber sehr verschieden [Dickens[1]) Elliott[2]), Boyland[3])].

Ganz anders verhält sich die als Substrat zugesetzte Milchsäure. Während sie überall genau so wie Glucose die Atmung erhöhen bzw. aufrechterhalten kann, ist die Größe ihres Umsatzes bei den verschiedenen Geweben sehr verschieden (Tab. 2).

Tabelle 2.

Milchsäureoxydation der Gewebe.

Gewebe	mg Milchsäure		mg Milchsäure verbraucht	Äquivalent des Gesamtsauerstoffs in mg Milchsäure	Äquivalent des Extrasauerstoffs in mg Milchsäue
	Anfangswert	Endwert			
Darmschleimhaut	8,9	8,8	0,1	2,7	0,6
Darmschleimhaut	4,0	4,2	0	3,5	0,4
Darmschleimhaut	6,0	5,4	0,6	2,8	0,7
Gehirn (Ratte)	11,2	9,2	2,0	3,7	2,2
Gehirn (Ratte)	6,6	3,8	2,8	3,6	0,7
Hühnerembryo (8 Tage)	6,6	6,8	0	1,2	0
Hühnerembryo (11 Tage)	7,2	7,0	0,2	1,6	0
Jensen-Sarkom	10,3	8,0	2,3	2,1	0
Jensen-Sarkom	18,8	17,0	1,8	2,3	0

Gehirn und Tumor verbrauchen in unseren Versuchen Milchsäure etwa in dem gleichen Maße wie Glucose, der Umsatz

[1]) Nature **30**, 512 (1940).
[2]) Vgl. S. 178, Anm. 5.
[3]) Nature **30**, 513 (1940).

bei Darmschleimhaut und Embryo ist dagegen nahezu oder gleich Null — wir haben für Schnitte von Rattengehirn einen durchschnittlichen Milchsäureschwund von 2,0 mg pro 100 mg Trockengewebe in der Stunde erhalten, während sich aus den Versuchen von Ashford und Holmes[1]) für Kaninchengehirn 2,1 errechnet, und für Tumor 0,9 mg gegenüber Elliott[2]) 0,6 mg. Die Angaben von Needham[3]) für Embryonen beziehen sich nur auf manometrische Messungen, sind also nicht zu vergleichen. In allen Geweben, auch in den milchsäureverbrauchenden, ist aber im Gegensatz zu einzelnen Versuchen von Ashford und Holmes[1]) die Gesamtsauerstoffaufnahme größer als der Milchsäureschwund, und nur in wenigen Versuchen mit Gehirn könnte der Extrasauerstoff ihn decken. Messungen des respiratorischen Quotienten unter den gleichen Bedingungen, bei denen mit Glucose stets ein Anstieg auf 1 erfolgte, ergaben nur bei Gehirn einen ebenso hohen Wert (0,8—0,95), während er bei Darmschleimhaut dem der Leeratmung entsprach (0,7). Holmes[1]) gibt bei Gehirn für den Extrasauerstoff Werte um 1 herum an. Ob man aus diesen Versuchen Rückschlüsse über den oxydativen Abbau der Glucose ziehen und die Milchsäure wenigstens für gewisse Gewebe als Zwischenprodukt ausschalten will, hängt davon ab, inwieweit Milchsäure als solche überhaupt intermediär im oxydativen Zellstoffwechsel auftritt. Nimmt man irgendwie labile oder aktivierte C_3-Formen als Zwischenstufe an, so können diese natürlich Eigenschaften haben, die zugesetzter Milchsäure abgehen. Läßt man jedoch Milchsäure als Zwischenprodukt gelten, so ist wenigstens für Darmschleimhaut und Embryo ein Kreislauf im Sinne Meyerhofs, der auch aus anderen Gründen heute wohl für die meisten Gewebe außer Muskel abgelehnt wird, sicher auszuschalten (vgl. Dixon[4]).

Mit Brenztraubensäure als Substrat für die Gehirnatmung beschäftigen sich viele Arbeiten der Oxford-Schule[5]), mit

---

[1]) Vgl. S. 177, Anm. 3. [2]) Bio. J. 29, 1937 (1935).

[3]) Vgl. S. 177, Anm. 4. [4]) Biolog. Reviews 12, 431 (1937).

[5]) R. A. Peters u. R. H. St. Thompson, Bio. J. 28, 916 (1934); G. K. Mac Gowan, Bio. J. 31, 1627 (1937); C. Long, Bio. J. 32, 1711. (1938).

ihrem Umsatz in anderen Geweben und ihrem Abbau der Kreis um Szent Györgyi[1]) und Krebs[2]). Wir haben sie aus äußeren Gründen bisher nur im Versuch mit Gehirn und Darmschleimhaut geprüft. Beide Gewebe setzen Brenztraubensäure in beträchtlichem Maße um (Tab. 3).

Tabelle 3.

Brenztraubensäureoxydation der Gewebe.

Gewebe	mg Brenztraubensäure		mg Brenztraubensäure verbraucht	Äquivalent des Gesamtsauerstoffs in mg Brenztraubensäure	Äquivalent des Extrasauerstoffs in mg Brenztraubensäure
	Anfangswert	Endwert			
Darmschleimhaut	7,6	4,0	3,6	3,7	0
Darmschleimhaut	7,2	3,7	3,5	4,3	1,0
Gehirn (Ratte)	6,9	0,9	6,0	4,1	—
Gehirn (Meerschweinchen)	6,6	3,9	2,7	1,8	—

Von 100 mg Gewebe werden in einer Stunde bei Darmschleimhaut durchschnittlich 3,3 mg, bei Gehirn 3,9 mg zum Verschwinden gebracht. Dabei entspricht bei Darmschleimhaut die aufgenommene Menge Gesamtsauerstoff (wieder nur bei einem geringen Wert an Extrasauerstoff) einer völligen Oxydation der Säure, d. h. es werden pro Molekül Brenztraubensäure 5 Atome Sauerstoff aufgenommen, während bei Gehirn die Sauerstoffaufnahme geringer ist und nur einem Verschwinden von 3 Atomen pro Molekül Brenztraubensäure entspricht. Der respiratorische Quotient liegt in beiden Fällen oberhalb 1 (1,05—1,2). Für die vollständige Oxydation würde sich ein Wert von 1,2 ergeben, den auch Elliott[3]) für Tumor und die Oxforder Schule[4]) für Gehirn angegeben haben. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Milchsäure bestätigen

[1]) A. v. Szent Györgyi, Studies on Biol. Oxidation and some of its Catalysts (1937).

[2]) H. A. Krebs u. W. A. Johnson, Bio. J. **31**, 645 (1937); H. A. Krebs u. a., Bio. J. **34**, 442, 775, 1046, 1234, 1383 (1940); H. A. Krebs, Bio. J. **34**, 1383 (1940).

[3]) Bio. J. **31**, 1003, 1021, 1268 (1937).

[4]) Vgl. S. 182, Anm. 5.

also auch unsere Versuche hier die allgemeine Annahme, die in Brenztraubensäure ein Zwischenprodukt der Atmung bzw. das für die Fermente des terminalen Abbaus spezifische Substrat sieht[1]). Über den Abbauweg sagen sie nichts aus. Nicht beobachtet haben wir bei Darmschleimhaut den in Taubenleberbrei von Krebs[2]) beschriebenen erhöhten Verbrauch von Brenztraubensäure, der unter Aufnahme von CO_2 zur Oxalessigsäure als Intermediärprodukt in Kohlensäureatmosphäre führen soll. Auch sahen wir keine Anhaltspunkte für eine Kohlehydratsynthese, wie sie die Theorie von Szent Györgyi[3]) fordert, Elliott[4]) aber auch bei den meisten Geweben vermißte, oder für einen beträchtlicheren Übergang in Milchsäure. Geringe Schwankungen würden uns allerdings wegen der zu kleinen Ansätze entgehen.

Was sagen nun die Versuche mit verschiedenen Zellgiften über den Abbauweg der Glucoseatmung aus?

Daß das System des terminalen Abbaus wichtig ist, zeigt die allgemein bekannte Hemmung der Substratatmung durch Blausäure (Tab. 4).

Tabelle 4.
Blausäurehemmung bei Geweben.

Gewebe	Substrat	Verbrauch mg/100 mg Gewebe, 2 Stdn.		Q_{O_2}	
		ohne KCN	mit KCN	ohne KCN	mit KCN
Darmschleimhaut	Glucose	7,3	4,4	19	6
Darmschleimhaut	„	3,9	4,1	—	—
Darmschleimhaut	„	—	—	24	8
Hühnerembryo (9 Tage)	„	—	—	8	0,9
Darmschleimhaut	Milchsäure	—	—	17	4
Hühnerembryo (9 Tage)	„	—	—	8	0,3
Darmschleimhaut	Brenztraubensäure	10,1	7,6	25	21
Darmschleimhaut	desgl.	5,7	7,3	19	20
Gehirn (Ratte)	„	7,3	5,3	13,5	7
Gehirn (Ratte)	„	7,9	5,7	13	8

[1]) C. Oppenheimer, „Die Fermente und ihre Wirkungen". Supplementbd. II, 1257 (1939).
[2]) Vgl. S. 182, Anm. 3.
[3]) Vgl. S. 183, Anm. 2.
[4]) Vgl. S. 181, Anm. 2.

Sie tritt stets mit Glucose und Milchsäure ein, läßt jedoch bei den verschiedenen Geweben je nach ihrem Zustand und den Versuchsbedingungen einen gewissen Anteil als unempfindliche Restatmung übrig. Dieser war in unseren Versuchen mit beiden Substraten bei Darmschleimhaut in Ringer-Lösung etwa 30 Proc. der Gesamtatmung, bei Embryonalgewebe nahezu 0 Proc. Der Glucoseschwund dagegen ist bei Darmschleimhaut wie bei Tumor, Niere (J. Jany und C. Selley[1]) und Erythrocyten (C. Schlayer[2]) weniger gehemmt, da eine starke Glycolyse einsetzt, während für Gehirn, das gegen Sauerstoffmangel besonders empfindlich ist, das Aufhören jeglichen Stoffwechsels beschrieben wird (J. Jany). Daß die Veratmung der Brenztraubensäure durch KCN/1000 bei Darmschleimhaut nicht gehemmt wird, beruht wohl nur auf der bekannten blausäureentgiftenden Wirkung dieser Säure und besagt nichts über die beteiligten Fermentsysteme. Für Gehirn fanden wir die Atmung auf die Hälfte, den Brenztraubensäureverbrauch um 25 Proc. herabgesetzt.

Die Hemmung der Glucoseatmung durch Jodessigsäure, die von den verschiedenen Autoren als Beweis für und gegen die Gültigkeit des Embden-Meyerhof-Schemas bei der Atmung angeführt wird (vgl. oben), ist jedenfalls mit $^{m}/_{1000}$-Jodacetat in bezug auf Sauerstoff- und Glucoseverbrauch bei Gehirn und Darmschleimhaut stark ausgeprägt (Tab. 5, S. 186). Sie setzt (aus den Werten der ersten 20 Minuten berechnet) mit 40—60 Proc. ein, um im Laufe von 2 Stunden 70—100 Proc. zu erreichen. Dieses Anwachsen mit der Zeit wird auch von Krebs[3]) angegeben, und von Meyerhof[4]) bei der Glycolyse durch ein allmähliches Eindringen des Giftes in die Zellen erklärt. Eine Umschaltung auf die Eigenatmung der Gewebe kann deshalb nicht stattfinden, weil diese genau die gleiche Empfindlichkeit gegen Jodessigsäure zeigt. Wenn nun Jodacetat hierbei nur auf die Anfangsglieder der Abbaukette, d. h. auf diejenigen Fermentprozesse einwirkt, die bei der

[1]) Bio. Z. **236**, 348 (1931).
[2]) Bio. Z. **293**, 94 (1937).
[3]) Vgl. S. 178, Anm. 5.
[4]) O. Meyerhof u. E. Boyland, Bio. Z. **237**, 406 (1931).

Tabelle 5

Jodacetathemmung bei Geweben.

Gewebsart	Substrat	Verbrauch mg/100 mg Gewebe, 2 Stdn.		Q_{O_2} 1. Stunde / 2. Stunde	
		ohne Jodac.	mit Jodacetat	ohne Jodac.	mit Jodacetat
Darmschleimhaut	Glucose	3,2	0	12 / 10	4 / 0,5
Gehirn (Ratte)	„	3,4	0,4	14 / 12	6,0 / 0,9
Darmschleimhaut	Milchsäure	—	—	16 / 11	4 / 3
Gehirn (Kaninchen)	„	—	—	8 / 6	7 / 5
Darmschleimhaut	Brenztraubensäure	6,6	1,1	13	7,8 / 2,8
Gehirn (Ratte)	„	10,6	6,7	21 / 13	16 / 7
Darmschleimhaut	ohne Substrat	—	—	12 / 8	3 / 1
Gehirn (Ratte)	„	—	—	6 / 4	4 / 0,6

phosphorylierenden Glycolyse gehemmt werden, so müßte der Abbau von Milchsäure und Brenztraubensäure auch in Gegenwart von Jodacetat ungehindert vonstatten gehen. Für Milchsäure macht Krebs[1]) bei Gehirn, Hoden und Sarkom entsprechende Angaben. Bei längeren Versuchszeiten beobachtet er allerdings auch hier ein Absinken der Atmung, was er durch ein allmähliches Zugrundegehen der Zelle infolge der Gärungshemmung erklärt. Wir sahen bei den verschiedenen Geweben mit Milchsäure als Substrat insofern Unterschiede, als wir bei Gehirn die Wirkungslosigkeit des Giftes auf die Atmung bestätigen konnten, während bei Darmschleimhaut, für die Milchsäure in unseren Versuchen ja kein Substrat ist, die Atmung genau wie mit Glucose oder im Leerversuch gehemmt ist. Empfindlich gegen Jodacetat ist aber immer die Veratmung der Brenztraubensäure. Aus Versuchen von Peters

[1]) Vgl. S. 177, Anm. 2.

und Mitarbeitern[1]) geht das für Gehirn hervor. Wir fanden für Gehirn und Darmschleimhaut eine Anfangshemmung der Atmung (berechnet aus den ersten 20 Minuten) von etwa 20 Proc., die bis zu 60 Proc. im Laufe der folgenden 2 Stunden ansteigt. Parallel dazu ist der Umsatz der Brenztraubensäure auf 20—70% des Normalumsatzes innerhalb zweier Stunden herabgesetzt. Auch hier scheint die Darmschleimhaut empfindlicher zu sein.

Wenn diese Versuche gegen den normalen Abbau der Glucose zu sprechen scheinen, so sind für ihn unsere Ergebnisse mit Natriumfluorid/100 anzuführen (Tab. 6).

Tabelle 6.

Fluoridhemmung bei Geweben.

Gewebsart	Substrat	Verbrauch mg/100 mg Gewebe, 2 Stdn.		Q_{O_2}	
		ohne NaF	mit NaF	ohne NaF	mit NaF
Darmschleimhaut	Glucose	6,1	0	21	17
Gehirn	„	4,1	2,8	9	4,6
Hühnerembryo (8 Tage)	„	—	—	6,5	6
Jensen-Sarkom	„	—	—	7,0	4
Darmschleimhaut	Milchsäure	0	0,9	12	10
Gehirn (Ratte)	„	2,6	2,3	16	14
Hühnerembryo (8 Tage)	„	—	—	8	6
Jensen-Sarkom	„	—	—	10	3
Darmschleimhaut	Brenztraubensäure	3,7	3,0	12	11
Darmschleimhaut	ohne Substrat	—	—	21	19
Gehirn	„	—	—	8	3
Hühnerembryo (8 Tage)	„	—	—	8,5	8,5
Jensen-Sarkom	„	—	—	13	4

Die Glucoseatmung ist zwar wechselnd stark bei den einzelnen Geweben und auch in den einzelnen Versuchen mit dem gleichen Gewebe gehemmt — so sahen wir bei Darmschleimhaut und Embryo oft gar keine, bei Gehirn meist und bei Tumor

[1]) Bio. J. 29, 53 (1935).

immer eine Hemmung — aber der Grund hierfür liegt darin, daß bei den verschiedenen Geweben die Eigenatmung verschieden fluoridempfindlich ist, und daß bei Vergiftung der Substratatmung einfach auf sie umgeschaltet wird. Die Unterschiede verschwinden, wenn man den Zuckerumsatz mißt, denn er ist gerade bei Darmschleimhaut gleich Null, während er bei Gehirn um 50 Proc. gehemmt ist. Demgegenüber sind mit Brenztraubensäure bei Darmschleimhaut weder Atmung noch Substratverbrauch gehemmt, was für Gehirn und Embryo auch aus Arbeiten von Peters[1]) und Szent Györgyi[2]) hervorgeht. Das gleiche zeigte Holmes[3]) mit Milchsäure als Substrat für Gehirn, bei dem wir zwar manchmal eine allerdings geringe und in keinem Verhältnis zur Glucosehemmung stehende Abnahme von Atmung und Milchsäureverbrauch sahen. Aus der Reihe fällt bei uns nur der Tumor, der auch mit Milchsäure stets eine deutliche Hemmung der Atmung zeigte.

So ist das Bild, das wir zeichnen können, durchaus nicht einheitlich. Manches spricht für, manches gegen die Gültigkeit des Embden-Meyerhof-Schemas auch für die Atmung. Daß das chemisch definierte Molekül der Milchsäure als Zwischenprodukt für die meisten Gewebe auszuschalten ist, würde natürlich noch nicht gegen den Wert der Gesamttheorie sprechen, und man wird weiteres Material sowohl über den noch umstrittenen phosphorfreien Abbau der Glucose bei der Glycolyse als auch über die Zellatmung sammeln müssen.

Beschreibung der Versuche.

Als *Gewebematerial* für die oben beschriebenen Versuche diente *Darmschleimhaut, Gehirnrinde, Jensen-Sarkom* und *Embryonalgewebe.* Die Schleimhaut des Dickdarms von Meerschweinchen wurde durch vorsichtiges Abschaben mit dem Spatel vom Muskel getrennt, und in Stückchen von etwa 15 mm Länge verwendet[4]). Aus Gehirnrinde (Ratten sind am besten geeignet, da das Gehirn von größeren Tieren leichter zum

[1]) Vgl. S. 187, Anm. 3.
[2]) H. 244, 105 (1936).
[3]) Vgl. S. 178, Anm. 3.
[4]) Vgl. E. Bumm, H. Appel u. K. Fehrenbach, H. 223, 207 (1934).

Verfall neigt, was z. B. nach Kraut und Nefflen[1]) die Werte für die Glycolyse stark beeinflußt), und aus Jensen-Sarkom von Ratten wurden mit dem Rasiermesser feine Schnitte hergestellt. Bei den Tumoren ist natürlich auf die Vermeidung von nekrotischem Material zu achten. Die Hühnerembryonen waren 7—11 Tage alt. Wegen ihrer gallertigen Beschaffenheit mußten sie als Brei verwendet werden.

Die Atmungsversuche haben wir in normalen Warburg-Gefäßen mit Anhang von etwa 20 ccm Inhalt ausgeführt, und jeweils 4 ccm Ringerlösung für Atmung nach Warburg[2]) unter Zusatz der jeweils zu untersuchenden Substrate und Gifte eingefüllt. Der Anhang enthielt 0,1 ccm 50-proc. Kalilauge. Durch einen nebenherlaufenden Versuch mit der üblichen Füllung (für einen Schnitt 1,0 ccm Ringer-Lösung und 0,1 ccm 8-proc. Kalilauge) haben wir uns überzeugt, daß in beiden Fällen die gleichen Werte für die Atmung gefunden wurden, die Vergrößerung des Normalansatzes also keinen Fehler bedeutet. Die Gewebemenge betrug je nach der Größe des Stoffwechsels etwa 50—100 mg Trockengewicht, was die Verwendung von mehreren Embryonen und von mehreren Gehirnen bedeutet. Gemessen wurde bei 37—38° in Sauerstoff meist 2 Stunden lang. Dabei war die Größe der Gewebemenge so berechnet, daß unter Ausnutzung der Gesamtskala der Manometer eine Ablesung der Sauerstoffaufnahme alle 20 Minuten möglich war. Allerdings mußte dann jeweils das Manometer geöffnet und auf den Ausgangswert eingestellt werden, was eine gewisse Fehlerquelle bedeutet. Eine zweite Unsicherheit kommt dadurch hinein, daß bei den manometrischen Messungen die ersten 15 Minuten der Periode, in der sich das Temperaturgleichgewicht einstellt, nicht in Erscheinung treten und aus den Werten der folgenden Periode geschätzt werden müssen, während sie den Substratwert natürlich direkt bestimmen. Die Übereinstimmung kann also nicht hundertprocentig genau erwartet werden.

Nach Beendigung des Versuches erfolgte die chemische Bestimmung der Substrate. Wir haben hierfür meist das Gewebe nach mehrfachem Spülen mit destilliertem Wasser entfernt, alle Filtrate gemeinsam auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und in einem aliquoten Teil die gewünschte Analyse ausgeführt. Das Trockengewicht der Schnitte ließ sich dann direkt bestimmen. Oder wir haben die Lösung ohne Entnahme der Schnitte direkt auf das gewünschte Volumen aufgefüllt, dann wurde vor der Bestimmung filtriert und das Trockengewicht des Gewebes in einem gesonderten Versuch festgestellt und umgerechnet. Daß eine vorhergehende Eiweißfällung an den Ergebnissen nichts ändert, hatten Vorversuche nach der Methode von Schenk, modifiziert von A. Hahn[3]), ergeben.

---

[1]) R. W. Nefflen, Diss. Dortmund (1934).
[2]) Bio. Z. 142, 317 (1923).
[3]) Z. f. Biol. 89, 149 (1929).

Die Glucosebestimmung erfolgte nach der Methode von Hagedorn-Jensen[1]) nach vorhergehendeer Enteiweißung mit Zink nach der Methode für Blutzucker. Die Milchsäurebestimmung führten wir nach vorhergehender Kupfer-Kalk-Fällung nach Fürth-Charnas, modifiziert nach Clausen[2]), aus. Die Brenztraubensäurebestimmung ließ sich nach der Methode von Clift und Cook[3]) direkt im Filtrat vornehmen. Vorhergehendes Kochen mit Alkali veränderte die Werte nicht. Unter unseren Versuchsbedingungen erhalten wir für alle drei Substanzen in Versuchen ohne Substrat völlige oder nahezu völlige Nullwerte, so daß mit den gefundenen Werten direkt gerechnet werden kann.

Unsere Bestimmung des respiratorischen Quotienten erfolgte nach der direkten Methode, läßt also alle an ihr geübte Kritik zu und gibt nur eine Orientierung (Dixon[4]). Wir glaubten, sie bei Darmschleimbaut, Gehirn und Embryo anwenden zu können, da hier eine meßbare aerobe Glycolyse nicht stattfindet. Eine Bestätigung brachte die bei Glucosezusatz stets erfolgende Erhöhung der Werte auf 1. Mit den Salzen der Milch- und Brenztraubensäure als Substrat muß man außer der Druckänderung im Manometer auch noch die Bicarbonatzunahme in der Lösung berücksichtigen, die sich nach der Warburgschen Methode[5]) in einem nebenherlaufenden Versuch messen läßt. Beide Werte addiert geben dann die gebildete Kohlensäuremenge.

---

[1]) Vgl. Oppenheimer u. L. Pincussen, „Die Methodik der Fermente". S. 1251 (1929).

[2]) H. Hirsch-Kauffmann, H. **140**, 25 (1924); G. Embden, H. 143, 297 (1925).

[3]) Bio. J. **26**, 1788 (1932).

[4]) Manometric Methods **45** (1934).

[5]) E. Negelein, Bio. Z. **158**, 121 (1925).

Über den Stoffwechsel des Schimmelpilzes Aspergillus niger.

I. Abbau der Citronensäure*);

von *Michaèl Deffner.*

Mit 1 Figur im Text.

[Aus dem Institut für Chemie und Landwirtschaft „Nikolaos Kanellopoulos" Abt. f. Org. Chemie u. Biochemie Piräus, Griechenland.]

(Eingelaufen am 4. Juni 1942.)

Nach Walker und Mitarbeitern soll das Primärprodukt des Citratabbaus durch den Schimmelpilz *Aspergillus niger*[1]) wie auch durch das *Bacterium pyocyaneum*[2]) die Acetondicarbonsäure sein, die weiterhin über Malonsäure zu Essigsäure, teilweise auch zu Bernsteinsäure abgebaut wird. Martius[3]) hat für den tierischen Organismus die primäre Umlagerung der Citronensäure über die *cis*-Aconitsäure in Isocitronensäure und deren Abbau über die Oxalbernsteinsäure zu α-Ketoglutarsäure und Bernsteinsäure bewiesen.

Vor 3 Jahren habe ich im Wielandschen[4]) Institut ein neues Schema für den *anaeroben* Abbau der Citronensäure durch Bakterien aufgestellt, das auch für das *B. pyocyaneum* gilt, wie gemeinsame Versuche mit Franke[5]) gezeigt haben. An der Spitze dieses Schemas steht der anaerobe Zerfall des Citronensäure-Moleküls in Oxalessigsäure und Essigsäure. Dieser Abbau wurde später durch Brewer und Werkman auch für den anaeroben Abbau der Citronensäure durch

*) Heinrich Wieland zum 65. Geburtstag in Verehrung und Dankbarkeit zugeeignet.

[1]) Th. K. Walker, V. Subramaniam u. F. Challenger, Soc. 1927, 3044.

[2]) Butterworth u. Walker, Bio. J. 23, 926 (1929).

[3]) C. Martius, H. 247, 104 (1937); 257, 29 (1938).

[4]) M. Deffner, A. 536, 44 (1938).

[5]) M. Deffner u. W. Franke, A. 541, 85 (1939).

Aerobacter indologenes[1]) bestätigt. Er gilt auch für den *aeroben* Abbau der Citronensäure durch Bakterien, wie unsere Versuche[2]) gezeigt haben.

Da die Ergebnisse von Walker und Mitarbeitern bei *B. pyocyaneum* von uns widerlegt wurden und da auch der früher im allgemeinen angenommene Abbau der Citronensäure über die Acetondicarbonsäure nach Martius nicht zutrifft, war nur noch zu untersuchen, ob etwa der Abbau der Citronensäure durch Schimmelpilze über die Acetondicarbonsäure verläuft, wie Walker annimmt, oder auf einem anderen Weg. Inzwischen wurde von der Eulerschen Schule[3]) und von Lynen und Neciullah[4]) im Wielandschen Institut bewiesen, daß auch bei der *Hefe* der Citronensäure-Abbau über die Isocitronensäure verläuft.

Meine Versuche beweisen nun, wie vorweggenommen sei, daß bei den Schimmelpilzen bzw. bei *Aspergillus niger* der Citronensäure-Abbau über die Isocitronensäure verläuft und nicht, wie Walker und Mitarbeiter angenommen haben, über die Acetondicarbonsäure.

Züchtung der Pilze. — Methodik.

Ich habe nicht mit wachsenden Pilzen gearbeitet wie Walker, um dem Einwand, der sich allgemein gegen die Methode des „Verwendungsstoffwechsels" erheben läßt, zu entgehen, daß nämlich irgendwelche faßbaren Abbauprodukte nicht direkt aus der zugesetzten C-Quelle stammen, sondern indirekt aus primär daraus aufgebauten Zellsubstanzen (z. B. Aminosäuren).

Zu den Versuchen wurden verschiedene Stämme von *Aspergillus niger* verwendet*). Sie wurden auf einer Nährlösung gezüchtet, die pro Liter

---

[1]) C. R. Brewer u. C. H. Werkman, Enzymologia **6**, 273 (1939).

[2]) Vgl. Anm. 5, S. 191.

[3]) H. v. Euler, E. Adler, G. Günther u. L. Elliot, Enzymologia **6**, 337 (1939).

[4]) F. Lynen u. N. Neciullah, A. **541**, 203 (1939).

*) Für die freundliche und kostenlose Überlassung von 4 *Aspergillus niger*-Stämmen bin ich Herrn Prof. Dr. K. Bernhauer zu großem Dank verpflichtet.

3 g NH_4NO_3, 1 g KH_2PO_4, 0,4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ und Spuren von Eisen enthielt (Lösung L); als C-Quelle wurde benutzt sowohl Citronensäure (20 g pro Liter der Lösung *L*. p_H der Nährlösung = 2,3), als auch Glucose oder Rohrzucker (30 g pro Liter der Lösung *L*). Im letzten Fall wurde Weinsäure oder Citronensäure zugesetzt (2 g), um das p_H der Lösung auf etwa 2,9—3,1 einzustellen. Die Nährlösung wurde mit frischer Sporensuspension geimpft.

Die Pilze wurden anfangs in kleinen Petri-Schalen bei 34—36° gezüchtet. Das junge, 3 Tage alte, weiße Pilzmycel wurde fein gemahlen und der Pilzbrei für die Versuche verwendet. Der Brei war sehr aktiv, aber die Menge des gebildeten Pilzes gering. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden die Pilze länger gezüchtet. Diese älteren, vor der Sporenbildung noch weißen Pilzmycele waren inaktiv. Ich habe es daher vorgezogen, die Pilze wie folgt zu züchten:

Rollflaschen von 6—7 Liter wurden mit 1,5 Liter Nährlösung beschickt und im Autoklaven sterilisiert. Nach dem Erkalten wurde mit einer kräftigen frischen Sporensuspension geimpft, mit Sauerstoff gefüllt und mit einem sterilen Gummistopfen verschlossen. Die Flaschen wurden bei 34—38° stark geschüttelt, so daß die Nährflüssigkeit mit dem Sauerstoff gut in Berührung kam. Es muß dafür gesorgt werden, daß immer Sauerstoff vorhanden ist. Am zweiten und dritten Tag wurde daher der Sauerstoff erneuert und am vierten oder spätestens fünften Tag die Pilzmasse durch eine Glasfilternutsche (*Jena 26 G 2* oder *26 G 3*) abfiltriert, mit Wasser gewaschen und leicht ausgepreßt. Längere Zeit gezüchtete Pilze erwiesen sich als inaktiv. Es wurde nicht unter sehr streng sterilen Bedingungen gearbeitet, denn wegen des sauren p_H der Lösung, der starken Impfung und der Spezifität der Nährlösung wurde nie eine Fremdinfektion festgestellt. Die auf diese Weise gezüchteten Pilze bezeichne ich als *feuchte Pilzfäden*. Ausbeute aus 1,5 Liter Nährlösung 10—15 g *feuchte Pilzfäden* von 3—6 g Trockengewicht.

Es wurden auch Versuche angestellt mit Pilzen bzw. *feuchten Pilzfäden*, die direkt in kleinen Portionen in flüssige Luft oder flüssigen Stickstoff eingetragen wurden, analog den Versuchen von Lynen[1]) bei Hefe. Pilze, die inaktiv waren, wie z. B. solche, die längere Zeit gewachsen waren oder die im Eisschrank lange aufbewahrt worden waren, konnten nach dem Einfrieren in flüssiger Luft nicht aktiviert werden.

I. Präparative Versuche mit wachsenden Pilzen.

Zunächst habe ich die Versuche von Walker und Mitarbeitern[2]) an drei verschiedenen Stämmen von *Asp. niger*

[1]) F. Lynen, A. **539**, 1 (1939).

[2]) Th. K. Walker, V. Subramaniam u. F. Challenger, Soc. **1927**, 3044.

nachgearbeitet. Ich habe meine Versuche aber so durchgeführt wie die mit *B. pyocyaneum*[1]). *Aceton* konnte ich nicht nachweisen. Oft habe ich auch die Nährflüssigkeiten, auf denen die Pilze kurze oder längere Zeit gezüchtet wurden, auf Aceton untersucht. In *keinem Falle* konnte ich mit Sicherheit Aceton nachweisen. Über die Ursache der Diskrepanz zwischen den Angaben der englischen Autoren und meinen kann ich, genau wie auch beim *B. pyocyaneum*, im Augenblick nichts Bestimmtes aussagen. Ich glaube aber, daß es sich nicht um ein grundsätzlich verschiedenes Verhalten der verwendeten *Aspergillus*-Stämme handelt, und neige vielmehr zu der Annahme, daß den englischen Forschern vielleicht irgendein — nachträglich schwer feststellbarer — methodischer Fehler unterlaufen ist.

Walker und Mitarbeiter stützen ihr Citronensäure-Abbauschema besonders auf den Nachweis und die Bestimmung des Acetons. Nachdem mir dieser Nachweis nicht gelungen ist, bin ich der Ansicht, daß der Abbau der Citronensäure über die Acetondicarbonsäure nicht bewiesen ist. Es war daher zu untersuchen, wie nun die Citronensäure wirklich abgebaut wird.

II. Versuche mit Methylenblau als Wasserstoffacceptor.

Die Versuche mit Methylenblau als Wasserstoffacceptor habe ich angestellt, um aus der Geschwindigkeit der Reaktion mit verschiedenen Substraten Schlüsse auf die evtl. Zwischenprodukte des Citronensäureabbaus zu ziehen. Bei dieser Gelegenheit habe ich auch das Vorkommen verschiedener Dehydrasen untersucht.

Von den Dehydrasen des *Asp. niger* wurde bis jetzt näher untersucht nur die sog. *Glucoseoxydase* (Glucoseoxhydrase). D. Müller[2]) konnte diese isolieren. W. Franke und Lorenz[3]) haben sie als *Dehydrase* (oxytrope) sichergestellt und W. Franke und M. Deffner[4]) als *Gelbes*

[1]) M. Deffner u. W. Franke, A. **541**, 85 (1939).
[2]) Erg. Enzymforsch. **5**, 259 (1936).
[3]) A. **532**, 1 (1937).
[4]) A. **541**, 117 (1939).

Ferment erkannt. Müller konnte in seinen *Glucoseoxydase*-präparaten auch *Äpfelsäuredehydrase* nachweisen.

A. *Versuchstechnik.* Die Methylenblauversuche wurden in evakuierten Thunberg-Röhren nach Bertho[1]) angestellt. Zur Herstellung vollkommen homogener Pilzsuspensionen wurden die *feuchten Pilzfäden* mit der entsprechenden Menge Phosphatpuffer in einem Porzellanmörser *leicht* verrieben. Der allgemeine Ansatz meiner Versuche war:

5,0 ccm Pilzsuspension in $^{m}/_{15}$-Phosphatpuffer (p_H 6,8—7,1).
1,0 ccm $^{m}/_{2}$- oder $^{m}/_{10}$-Substratlösung (als Na-Salz).
0,5 ccm Methylenblau 1 : 1000 (etwa $^{m}/_{375}$).
Gesamtvolumen 6,5 ccm; Versuchstemperatur 34°.

Als *Versuchsbeginn* wurde der Zeitpunkt, zu dem das evakuierte Röhrchen in den Thermostaten eingesenkt wurde, als *Entfärbungszeit t* — zwecks größerer Ablesegenauigkeit — die Zeitpunkte einer 90- und 100 proc. Entfärbung (Vergleichsskala) notiert. Die meisten Ansätze wurden doppelt ausgeführt.

B. *Mycelalter und -aktivität.* Von großer Bedeutung für die Dehydrasenaktivität ist das Alter des Pilzes. Ich habe vergleichend die Entfärbungszeit desselben Pilzstammes verschiedenen Alters mit und ohne Substrat gemessen. Als Substrate für diese Versuche wurden Milchsäure, Bernsteinsäure und Citronensäure benutzt.

Tabelle 1.

Die Versuche wurden *sofort* nach der Ernte des Pilzes angestellt. Pilzstamm 12 BAW Prag. *Versuch 1: 3 Tage* auf Citrat gezüchtet, Ausbeute 9 g *feuchte Pilzfäden* aus 1,5 Liter Nährlösung. *Versuch 2:* Eine andere ähnliche Pilzzüchtung.

Entfärbung	Versuch 1		Versuch 2	
	90%	100%	90%	100%
Pilztrockengewicht in Milligramm	60	60	30	30
Entfärbungszeit in Min. ohne Substrat . .	9,5	12,5	31	47
„ „ „ mit Citronensäure	6,5	8,5	22	31
„ „ „ „ Milchsäure . .	2,0	3,0	7	11
„ „ „ „ Bernsteinsäure	5,5	7,0	23	32

[1]) Methodik vgl. Bertho-Graßmann, Bio. Praktikum, S. 152. Leipzig 1936.

Tabelle 2.

Dieselben Pilzzüchtungen wie in Tab. 1, nur wurden die Versuche angestellt, nachdem die feuchten Pilzfäden im Eisschrank 2 Tage lang aufbewahrt wurden.

Entfärbung	Versuch 1		Versuch 2	
	90%	100%	90%	100%
Pilztrockengewicht in Milligramm	35	35	26	26
Entfärbungszeit in Min. ohne Substrat . .	>240	—	>240	—
„ „ „ mit Citronensäure	>240	—	>240	—
„ „ „ „ Milchsäure . .	3	3,5	10,5	14
„ „ „ „ Bernsteinsäure	11	17	25	33

Tabelle 3.

Die Versuche wurden *sofort* nach der Ernte des Pilzes angestellt. Pilzstamm 12 BWA Prag. *Versuch 1: 4 Tage* auf Citrat gezüchtet, Ausbeute 17 g *feuchte Pilzfäden* aus 1, 5 Liter Nährlösung. *Versuch 2:* Eine andere ähnliche Pilzzüchtung.

Entfärbung	Versuch 1		Versuch 2	
	90%	100%	90%	100%
Pilztrockengewicht in Milligramm	165	165	160	160
Entfärbungszeit in Min. ohne Substrat . .	29	43	24	48
„ „ „ mit Citronensäure	26	41	24	41
„ „ „ „ Milchsäure . .	17	24	12	17
„ „ „ „ Bernsteinsäure	20	29	16	27

Tabelle 4.

Dieselben Pilzzüchtungen wie in Tab. 3, nur wurden die Versuche angestellt, nachdem die feuchten Pilzfäden im Eisschrank 2 Tage lang aufbewahrt wurden.

Entfärbung	Versuch 1		Versuch 2	
	90%	100%	90%	100%
Pilztrockengewicht in Milligramm	160	160	165	165
Entfärbungszeit in Min. ohne Substrat . .	410	—	>240	—
„ „ „ mit Citronensäure	215	—	>240	—
„ „ „ „ Milchsäure . .	18	29	8	11
„ „ „ „ Bernsteinsäure	48	81	36	54

Pilze, die länger als 4 Tage gezüchtet wurden, sind inaktiv. Für die Methylenblauversuche am günstigsten sind die Pilze, die bei reichlicher Sporenimpfung nur *drei* Tage auf Citronensäure gewachsen sind.

Die *Milchsäuredehydrase* ist auch nach fünftägigem Aufbewahren im Eisschrank zum größten Teil noch vorhanden. Die *Bernsteinsäuredehydrase* ist zwei Tage lang und die *Citronensäuredehydrase* höchstens einen Tag im Eisschrank haltbar. Entsprechend der Citronensäuredehydrase verhält sich auch die *Leeratmung* der Pilze. Darum sind Pilze, die einen bzw. zwei Tage im Eisschrank aufbewahrt wurden, geeignet für die Untersuchung verschiedener Dehydrasen, da sie kleine Leerentfärbung zeigen.

Um festzustellen, ob die Inaktivierung der älteren Pilzfäden durch Permeabilitätsänderungen der Zellwand verursacht wird, habe ich auch Versuche mit gefrorenen Pilzfäden angestellt analog den Versuchen von Lynen bei Hefe (a. a. O.).

Tabelle 5.

Dieselbe Pilzzüchtung wie bei Versuch 2 der Tab. 3. *Versuch 1:* Pilz sofort nach der Ernte in flüssige Luft eingetaucht und nach dem Auftauen (dieser Prozeß dreimal wiederholt) zu den Versuchen benutzt: *Versuch 2:* Der Pilz nach dem Auftauen mit Wasser gewaschen, abfiltriert und dann wie üblich die Versuche angestellt.

Entfärbung	Versuch 1		Versuch 2	
	90%	100%	90%	100%
Pilztrockengewicht in Milligramm	150	150	150	150
Entfärbungszeit in Min. ohne Substrat . .	40	57	95	122
„ „ „ mit Citronensäure	40	57	82	116
„ „ „ „ Milchsäure . .	8	11	7	9
„ „ „ „ Bernsteinsäure	16	24	17	24

Aus diesen und anderen ähnlichen Versuchen, auch mit noch älteren Pilzen, sieht man, daß längere Zeit gezüchtete Pilze, die nicht so aktiv sind wie die nur 3 Tage lang gezüchteten, durch Einfrieren in flüssiger Luft nicht aktiviert werden. Die gefrorenen und ausgewaschenen Pilze zeigen mit *Bernsteinsäure* und *Milchsäure* dieselben Entfärbungszeiten wie die normalen Pilze. Dagegen ist die *Leer-* und *Citrat-*Entfärbungszeit bei den auf diese Weise behandelten Pilzen bedeutend größer. Man kann diese Tatsache erklären durch die Annahme, daß die *Milchsäuredehydrase* des *Asp. niger* im Gegensatz zu der entsprechenden Dehydrase des Muskels, aber analog der *Milchsäuredehydrase* der Hefe, beim Umsatz mit

Methylenblau als Wasserstoffacceptor kein *Co-Enzym* benötigt, da dieses unter den vorliegenden Bedingungen zum größten Teil ausgewaschen würde (vgl. analoge Versuche von Lynen bei Hefe). Die *Citronensäuredehydrase* bzw. *Isocitronensäuredehydrase* benötigt aber bekanntlich die *Co-Dehydrase II*, die unter den Versuchsbedingungen zum großen Teil ausgewaschen wird. Daher die größeren Entfärbungszeiten mit gefrorenem und ausgewaschenem Pilz. Über den Stoffwechsel des *Asp. niger* und die Fermentsysteme desselben sind weitere Versuche im Gange.

C. *Nährlösungen.* Die Züchtung der Pilze auf Citronensäure ist vorzuziehen, obwohl die Pilze auf Glucose oder Rohrzucker schneller wachsen (schon am dritten Tag muß man sie dort ernten), denn man erhält auf diese Weise einen sehr aktiven Pilz, der konstante Eigenschaften besitzt.

D. *Die p_H-Abhängigkeit.* Die p_H-Abhängigkeit der Entfärbungszeiten der drei untersuchten Säuren kommt in der folgenden Figur zum Ausdruck.

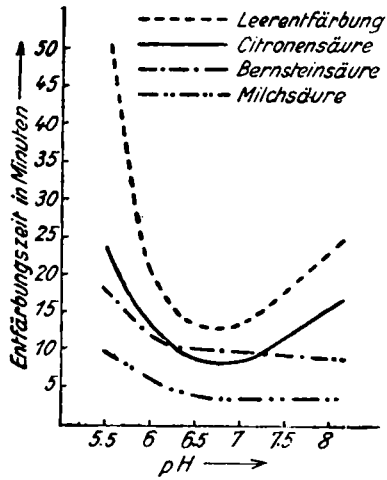


Fig. 1. Pilzstamm 12 BWA Prag. 3 Tage auf Citrat gezüchtet. Normale Ansätze mit dem entsprechenden Phosphatpuffer. 33 mg Pilztrockengewicht. Es wurde die Zeit der 90-proc. Entfärbung gemessen.

E. *Versuche mit verschiedenen Substraten.* Es wurden Versuche mit allen möglichen Substraten und Gemischen angestellt, die als Zwischenprodukte des Citronensäureabbaus

fungieren könnten. Parallel liefen jedesmal auch Versuche mit Milchsäure und Bernsteinsäure, um die Aktivitäten vergleichen zu können.

Bei den Ansätzen, in denen die Citronensäure bereits vor der Zugabe des MB. mit dem Pilz in Berührung war, wurde der Farbstoff schneller entfärbt als in den analogen Ansätzen, in denen das Substrat erst mit dem Farbstoff zusammen zugegeben wurde.

Tabelle 6.

Pilz: Stamm 12 BWA Prag, 30 mg trocknes Gewicht p_H 6,9. Es wurde die Zeit einer 90-proc. Entfärbung gemessen.

Leerentfärbungszeit	31 Min.
Entfärbungszeit mit Citronensäure, die zusammen mit dem MB. d. Pilz zugegeben wurde	22 „
„ „ „ die 25 Min. vor dem MB. d. Pilz zugegeben wurde	17 „
„ „ Bernsteinsäure	23 „
„ „ Milchsäure	7 „

Diese Tatsache kann mit allen drei zur Diskussion stehenden Abbauschemata erklärt werden. Denn bei allen dreien ist die erste Phase des Abbaus anaerob. Dann muß aber gefordert werden, daß die in dem betreffenden Schema angenommenen Zwischenprodukte, wenn man sie für sich als Substrat zugibt, tatsächlich schneller dehydriert werden als die Citronensäure. Es wurde daher jede Abbaumöglichkeit getrennt auf die Erfüllung dieser Forderung hin untersucht.

Die Versuche wurden wie üblich angestellt; nur um eine eventuelle Hemmung bei den Ketoderivaten zu vermeiden, wurde statt 1 ccm nur 0,2 ccm $^m/_3$-Lösung von jedem Substrat pro Ansatz verwendet.

a) *Abbau über Essigsäure + Oxalessigsäure.* Es wurden die Entfärbungszeiten mit Citronensäure, Essigsäure, Oxalessigsäure und einem Gemisch von Essigsäure und Oxalessigsäure gemessen.

Nach diesem Versuch ist kein Grund vorhanden, den Abbau über Essigsäure und Oxalessigsäure für wahrscheinlich zu halten. Das Gemisch Essigsäure-Oxalessigsäure wird nicht schneller, sondern langsamer dehydriert als die Citronensäure.

Tabelle 7.

Pilz: Stamm 12 BWA Prag, 33 mg Trocken-Gewicht p_H 6,9. Es wurde die Zeit einer 90-proc. Entfärbung gemessen. *Versuch 1:* Der Pilz sofort nach der Ernte verwendet. *Versuch 2:* Nach 24 Stunden Aufbewahren desselben im Eisschrank.

	Versuch 1	Versuch 2
Leerentfärbungszeit	17 Min.	63 Min.
Entfärbungszeit mit Citronensäure	10 „	26 „
„ „ Essigsäure + Oxalessigsäure	11 „	70 „
„ „ Essigsäure	17 „	58 „
„ „ Oxalessigsäure	14 „	68 „
„ „ Bernsteinsäure	11 „	20 „
„ „ Milchsäure	5 „	5 „

b) *Abbau über Ameisensäure-Acetondicarbonsäure.* Es wurden die Entfärbungszeiten mit Citronensäure, Ameisensäure, Acetondicarbonsäure und einem Gemisch von Ameisensäure und Acetondicarbonsäure gemessen.

Tabelle 8.

Ansätze wie bei Tab. 7, aber eine andere Pilzzüchtung.

	Versuch 1	Versuch 2
Leerentfärbungszeit	13 Min.	39 Min.
Entfärbungszeit mit Citronensäure	7,5 „	18 „
„ „ Ameisensäure + Acetondicarbonsäure	15 „	40 „
„ „ Ameisensäure	13 „	39 „
„ „ Acetondicarbonsäure	15 „	39 „
„ „ Bernsteinsäure	8 „	12 „
„ „ Milchsäure	4 „	4 „

Auch der Abbau der Citronensäure über Ameisensäure-Acetondicarbonsäure erklärt nicht die Tatsache, daß die Citronensäure, die kurze Zeit mit dem Pilz in Berührung war, schneller dehydriert wird als diejenige, die zusammen mit dem MB. dem Pilz zugegeben wurde, denn ein Gemisch von Ameisensäure und Acetondicarbonsäure wird langsamer dehydriert als Citronensäure.

c) *Abbau über e-Isocitronensäure.* Es wurden die Entfärbungszeiten mit Citronensäure, *cis*-Aconitsäure und e-Isocitronensäure gemessen.

Tabelle 9.

Ansätze wie bei der Tab. 7, aber eine andere Pilzzüchtung.

	Versuch 1	Versuch 2
Leerentfärbungszeit	18 Min.	44 Min.
Entfärbungszeit mit Citronensäure	9 „	15 „
„ „ *cis*-Aconitsäure	8,5 „	14 „
„ „ e-Isocitronensäure	7,5 „	12 „
„ „ Bernsteinsäure	9 „	13 „
„ „ Milchsäure	4 „	4 „

Die e-Isocitronensäure wird schneller als die *cis*-Aconitsäure und diese schneller als die Citronensäure dehydriert. Damit ist bewiesen, daß die Citronensäure durch *Asp. niger* über *cis*-Aconitsäure —➤ e-Isocitronensäure abgebaut wird. Daß die Unterschiede nicht größer sind, beruht auf der Tatsache, daß das Ferment *Aconitase*, das die Citronensäure in Isocitronensäure bzw. die *cis*-Aconitsäure in Isocitronensäure und Citronensäure überführt, sehr aktiv ist, wie folgender Versuch beweist.

III. Nachweis der Aconitase.

Umwandlung der *cis*-Aconitsäure in Citronensäure.

Ich habe präparative Versuche angestellt, um die Aconitase nachzuweisen. Zugesetzte *cis*-Aconitsäure wurde bei Gegenwart von Na_2SeO_3 als Citronensäure isoliert. Es folgt die Beschreibung eines dieser Versuche.

30 g feuchte, auf Citrat 4 Tage lang gezüchtete Pilzfäden vom Trockengewicht etwa 6 g wurden in einer Rollflasche in 200 ccm 0,85-proc. NaCl + 30 ccm $^m/_2$-Phosphatpuffer vom $p_H = 7{,}0$ suspendiert. Es wurden 550 mg *cis*-Aconitsäureanhydrid, das mit NaOH neutralisiert wurde, und 10 ccm $^m/_2$-Na_2SeO_3 hinzugesetzt. Die Flasche wurde mit einem Gummistopfen, der mit einem Glashahn versehen war, geschlossen, evakuiert und bei 30° auf einer Schüttelmaschine geschüttelt.

Nach 60 Minuten wurden 50 ccm der Suspension abpipettiert, in diesen die gebildete Citronensäure nach Kometiani[1]) als Pentabromaceton bestimmt. Es waren im ganzen Ansatz 330 mg Citronensäure gebildet worden. Die Flasche wurde sofort evakuiert und weiter geschüttelt. Nach 3 Stunden wurde dasselbe wiederholt und 435 mg

[1]) Kometiani, Fr. 86, 359 (1931).

Citronensäure gefunden. Nach 20 Stunden wurde der Versuch abgebrochen. Es hatten sich 490 mg Citronensäure gebildet.

Die Citronensäure wurde auch als Chininsalz isoliert.

Bei einem Versuch, der ohne Aconitsäure parallel lief, wurden nach 2 Stunden 10 mg und nach 20 Stunden 4 mg Citronensäure gefunden.

Aus meinen Versuchen kann man den Schluß ziehen, daß bei den Schimmelpilzen bzw. *Asp. niger* der Citronensäureabbau nicht über Ameisensäure-Acetondicarbonsäure verläuft, wie Walker angenommen hat, sondern über die l-Isocitronensäure, Oxalbernsteinsäure, α-Ketoglutarsäure usw.

Auch bei den *Fischen* wird die Citronensäure über die Isocitronensäure abgebaut, wie ich später in anderem Zusammenhang berichten werde.

Zusammenfassend kann man über den biologischen Abbau der Citronensäure jetzt sagen, daß dieser im tierischen Organismus, den Schimmelpilzen und der Hefe über die (—)-Isocitronensäure, Oxalbernsteinsäure, α-Ketoglutarsäure usw. verläuft. Bei den Organismen, die auf Citronensäure als einziger C-Quelle wachsen, entsteht aus der α-Ketoglutarsäure durch Ammoniak die Glutaminsäure und aus dieser durch Umaminierung die übrigen Aminosäuren[1]). Nur bei den Bakterien wird die Citronensäure aerob und anaerob über Essigsäure-Oxalessigsäure abgebaut. Bei den Bakterien, die auf Citronensäure als einziger C-Quelle allein wachsen, würde dann aus der Oxalessigsäure bzw. Fumarsäure (Aspartasereaktion) durch Ammoniak die Asparaginsäure und daraus die übrigen Aminosäuren entstehen. So kann man auch erklären, daß in gewissen Milchsäurebakterien nach Befunden der Eulerschen Schule die Glutaminsäuredehydrase nicht vorkommt.

[1]) Über den biologischen Ab- und Aufbau der Aminosäuren vgl. W. Franke, Z. Ang. 52, 695 u. 703 (1939).

Über Fumarat-Hydrase als gelbes Ferment*).

Biochemische Hydrierungen IX[1]);

von *F. G. Fischer*, *A. Roedig*[2]) und *K. Rauch*.

Mit 1 Figur im Text.

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Würzburg.]

Eingelaufen am 4. Juni 1942.

Schon die Versuche, welche zur Auffindung der Fumarat-Hydrase führten, hatten die Vermutung nahegelegt, daß dieses Ferment entweder mit der Wirkung des damals einzig bekannten „gelben Ferments" verknüpft sei, oder aber, daß es selbst eine „gelbe Gruppe" enthielte[3]). Denn die Fumarat-Hydrase fand sich in den aus Hefe hergestellten Fraktionen des „gelben Ferments" und bewirkte die Hydrierung von Fumarsäure — im Gegensatz zur bekannten Succino-Dehydrase — nur mit Wasserstoffspendern, deren Potentiale unter −0,1 Volt lagen. Bei der weiteren Untersuchung der Fumarat-Hydrase galt es daher vor allem drei Fragen nachzugehen: der nach ihrem Verhältnis zum „gelben Ferment", der nach ihrer eigenen prosthetischen Gruppe und schließlich jener nach ihrer biologischen Funktion und ihren möglichen Beziehungen zur Succino-Dehydrase.

Inhaltsübersicht.

I. Fumarat-Hydrase und „Flavinenzym".
- A. Methodik der Wirksamkeitsbestimmungen: 1. Fumarat-Hydrase. 2. Flavinenzym.
- B. Gewinnung der Ausgangsstoffe.
- C. Versuche zur Trennung durch 1. Einwirkung organischer Lösungsmittel. 2. Fällungen mit Ammoniumsulfat. 3. Adsorptionen an Aluminiumhydroxyd. 4. Dialyse. 5. Elektrophorese.

*) Geh. H. Wieland zur Feier seines 65. Geburtstages gewidmet.

[1]) VIII. Mitteilung, Naturwiss. 30, 374 (1942).

[2]) Dissertation A. Roedig, Würzburg 1939.

[3]) F. G. Fischer u. H. Eysenbach, Biochemische Hydrierungen VI, A. 530, 99 (1937).

II. Co-Ferment und Aktivator der Fumarat-Hydrase.
- A. Spaltung und Rekombination: 1. Fällung der Proteinkomponente. 2. Rekombination.
- B. Aktivierung mit Lactoflavin und Lactoflavinphosphat.

III. Fumarat-Hydrase und Succino-Dehydrase.
- A. Versuche mit Hefe und Präparaten aus Hefe: 1. Lebende und plasmolysierte Hefe. 2. Trockenhefe und Macerationssäfte. 3. Gereinigte Fermentpräparate.
- B. Versuche mit tierischen Geweben.

IV. Zusammenfassende Bemerkungen.

I. Fumarat-Hydrase und „Flavinenzym".

Zu der Zeit der ersten Versuche zur Darstellung der Fumarat-Hydrase[1]) war nur das „alte" gelbe Ferment von Warburg und Christian[2]) bekannt und seine Wirkung als Katalyse der Oxydoreduktionen zwischen hydrierten Co-Dehydrasen einerseits und Sauerstoff bzw. Methylenblau andererseits nachgewiesen. Dieses Flavoproteid, nach der Warburgschen Bezeichnung „Alloxazin-Proteid $_{\text{Dihydropyridin}}$"[3]), wird in der vorliegenden Arbeit der Kürze halber stets Flavinenzym genannt.

Die Versuche zur Reinigung der Fumarat-Hydrase aus Hefe-Macerationssäften ergaben, daß die ersten Schritte zur Herstellung des Flavinenzyms auch zur Gewinnung der Hydrase geeignet waren und daß bei der weiteren Reinigung durch Fällungs- und Adsorptionsmittel beide Fermente sehr häufig vergesellschaftet auftraten[1]).

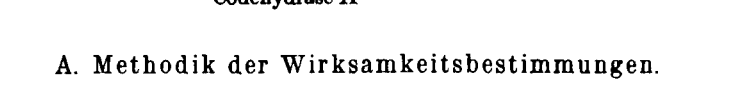
Zur Klärung ihres wechselseitigen Verhältnisses war daher zunächst nötig, einen quantitativen Vergleich ihrer Wirksamkeiten im Laufe verschiedener Reinigungsgänge durchzuführen. Die Bestimmung der Fumarat-Hydrase erfolgte durch Messung der Wiederfärbungsgeschwindigkeit eines geeigneten Leuko-Farbstoffes (Methylenviolett) im System

Leuko-Farbstoff ⟶ Fumarat-Hydrase ⟶ Fumarat,

---

[1]) Vgl. Anm. 3, S. 203.
[2]) Bio. Z. **266**, 377 (1933).
[3]) O. Warburg u. W. Christian, Bio. Z. **298**, 368 (1938).

die des Flavinenzyms durch Geschwindigkeitsmessungen im System



A. Methodik der Wirksamkeitsbestimmungen.

1. *Bestimmung der Fumarathydrase-Wirksamkeit.*

Als Farbstoff wurde Methylenviolett ($E_0' = -0{,}256$ Volt) verwendet, da es sich zeigte, daß es gewisse Vorzüge gegenüber dem früher verwendeten Janusrot hat. Die Geschwindigkeiten der Reoxydation beider Leukofarbstoffe sind gleich.

In ein Thunberg-Rohr werden einpipettiert: 1,0 ccm $^{m}/_{5000}$-Methylenviolett-Lösung, 0,1 ccm $^{m}/_{10}$-Kaliumfumarat-Lösung, ein bestimmtes Volumen der Fermentlösung (0,1—0,4 ccm) und soviel $^{m}/_{5}$-Phosphatpuffer von p_H 7, daß das Gesamtvolumen 2 ccm beträgt. Die Reduktion des Farbstoffes und die Ablesung der Geschwindigkeit seiner Rückbildung wurden in der schon beschriebenen Weise ausgeführt[1]). Meistens wurde mit der Stoppuhr die Zeit von einer 10-proc. bis zu einer 50-proc. Wiederfärbung bei 30° gemessen (Wiederfärbungszeit). Da sie unter den angewandten Bedingungen ein unmittelbares Maß für die Aktivität der Fermentlösungen darstellt, läßt sich die Zahl X der Ferment-Einheiten einer unbekannten Lösung bestimmen aus dem Verhältnis des Produktes von Wiederfärbungszeit und Fermentmenge der Bezugsfermentlösung zu jenem der zu bestimmenden Lösung.

Als Bezugspräparat wurde ein nach früher gemachten Angaben hergestelltes „gelbes Rohferment" verwendet, welches trocken völlig haltbar und sowohl als Fumarat-Hydrase wie als Flavinenzym stark wirksam war. Die in 0,2 ccm seiner Stammlösung (1 g in 10 ccm Wasser) enthaltene Fermentmenge wurde willkürlich als 1 Fumarathydrase-Einheit bzw. als 1 Flavinenzym-Einheit angenommen.

Wenn z. B. 0,2 ccm Lösung des Bezugsferments eine Wiederfärbungszeit von 80 Sekunden haben, 0,4 ccm der unbekannten Lösung eine solche von 160 Sekunden, so enthält diese Lösung 0,25 Fumarathydrase-Einheiten.

Bei pflanzlichen und tierischen Extrakten stört die Eigenfarbe und die zuweilen vorhandene leichte Trübung den Vergleich. In solchen Fällen wird eine entsprechende Menge der Extrakte in die Röhren der Vergleichsskala gegeben.

---

[1]) Vgl. Anm. 3, S. 203.

2. *Bestimmung der Flavinenzym-Wirksamkeit.*

Bei genügendem Überschuß der übrigen Bestandteile der genannten Systeme und konstanter Anfangskonzentration an Farbstoff bzw. Sauerstoff ist der Gehalt an Flavinenzym allein geschwindigkeitsbestimmend. Nachdem gute Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Auswertungsmethoden festgestellt worden war, wurde meistens die Dehydrierung des Neuberg-Esters im Methylenblau-Versuch gemessen. Dieser Ester wird ebenso rasch dehydriert wie Robison-Ester. Das Flavinenzym reagiert in Übereinstimmung mit den Beobachtungen Warburgs[1]) mit Sauerstoff etwas langsamer als mit Methylenblau. Aus der Methylenblau-Entfärbung berechneten sich z. B. in einem Falle 22 cmm O_2 in 5 Minuten, während 10 cmm gemessen wurden.

Folgende Mengen der verschiedenen Lösungen werden meistens zusammengegeben: 0,25 ccm $^{m}/_{1000}$-Methylenblau, 0,2 ccm Dehydrase, 0,2 ccm Cozymase, 0,1 ccm Neuberg-Ester, von 0,01 bis zu 0,2 ccm Flavinenzym und soviel $^{m}/_{5}$-Phosphatpuffer von p_H 7, daß die Gesamtmenge der Flüssigkeit 1,5 ccm beträgt. Thermostat-Temperatur = 30°.

Da die Wirksamkeit der Dehydrase-, zuweilen auch die der Codehydrasen-Lösungen schwankend ist, wird die zur maximalen Entfärbungsgeschwindigkeit notwendige Menge dieser Komponenten vor jeder Bestimmungsserie neu ermittelt. Ihre Konzentration wird also bei gleichbleibendem Flavoproteid-Gehalt zunächst so lange variiert, bis eine möglichst rasche Entfärbung erreicht ist. Dann wird versucht mit wechselnder Menge an Flavoproteid-Stammlösung eine der zu bestimmenden Flavinenzym-Lösung entsprechende Zeit zu erreichen. Bei gleicher Entfärbungszeit stehen die Zahlen der Ferment-Einheiten im umgekehrten Verhältnis der angewandten Fermentmengen.

Hemmung durch Sulfat-Ionen. Gereinigte Präparate von Flavinenzym zeigten im System der Neuberg-Ester-Dehydrierung mit Methylenblau als Acceptor oft eine viel geringere Wirksamkeit als erwartet. Dialysiert man derartige Lösungen bei 0°, so steigt ihre Wirksamkeit. Die Ursache dieser Hemmungserscheinungen ist der Gehalt der Fermentpräparate an Ammoniumsulfat, das ihnen von der Darstellung her anhaftet und bei der Dialyse entfernt wird. Setzt man den Versuchsansätzen mit gelbem Rohferment Ammoniumsulfat in steigender Konzentration zu, so beobachtet man schon bei einem Salzgehalt von 1 Proc. eine Verlängerung der Entfärbungszeit auf mehr als das Doppelte. Wenn die Salzkonzentration etwa 8 Proc. beträgt, ist die Fermentwirkung völlig unterbunden. Die hemmende Wirkung geht auf die Anionen zurück; sie ist eine allgemeine Eigenschaft der Sulfate. Für die Flavinenzym-Bestimmungen ist diese bisher nicht beschriebene Beobachtung von großer praktischer Bedeutung, da alle benutzten Lösungen frei von Sulfationen sein müssen.

---

[1]) Vgl. Anm. 2, S. 204.

B. Gewinnung der Ausgangsstoffe.

1. Zur Darstellung der *Trockenhefe* wurde frische untergärige Brauereihefe ausgewaschen, abgepreßt und bei 30° an der Luft getrocknet. Die früher über die Trocknungsdauer gemachten Erfahrungen[1]) konnten wiederholt bestätigt werden.

2. Der *Macerationssaft* wurde gewonnen durch 4-stündiges Belassen von Trockenhefe mit der $3^1/_2$-fachen Gewichtsmenge Wasser bei 35°. In der klar zentrifugierten tiefbraunen Lösung ist die Fumarat-Hydrase unbeständig; trocknet man den Saft i. V. ein, so lassen sich völlig haltbare Präparate gewinnen. Die Untersuchung eines von G. Buchner im Jahre 1899 dargestellten Trockenpulvers dieser Art ergab jedenfalls noch eine sehr hohe Fumarathydrase-Aktivität.

3. *Essigester-Autolysate* wurden durch 12-stündiges Rühren von 4 Gewichtsteilen abgepreßter, frischer Hefe mit 1 Gewichtsteil Essigester bei Zimmertemperatur erhalten. Bei kurz dauernder Plasmolyse mit Essigester wird keine Fumarat-Hydrase von der Hefezelle losgelöst.

4. *Gelbes Rohferment* wurde nach den früheren Angaben[1]) aus Trockenhefe hergestellt. Fumarathydrase- und Flavinenzym-Wirksamkeit sind im Trockenpräparat jahrelang, in Lösungen bei 0° mindestens 14 Tage unverändert haltbar. Die Lösung von 1 g in 10 ccm Wasser wurde als Stammlösung für die Bestimmungen der Fumarathydrase- und Flavinenzym-Wirksamkeiten verwendet.

5. *Zuckerphosphat-Dehydrasen* mußten möglichst frei von gelben Fermenten erhalten werden. Präparate, die dieser Anforderung hinreichend genügten, wurden gewonnen durch Kohlensäure-Fällung von Macerationssaft[2]). Sie waren im System der Neuberg-Ester-Dehydrierung ebenso gut wirksam wie in jenem der Robison-Ester-Dehydrierung. Nur bei Bestimmung kleinster Flavinenzym-Mengen (etwa 0,01 E) machte sich ihr Eigengehalt störend bemerkbar. Viel einfacher herzustellen sind Dehydrasen-Präparate aus Bohnen, die durch Extraktion von Bohnenmehl mit verdünnten sek. Natriumphosphat-Lösungen erhalten werden können. Sie dehydrieren Neuberg-Ester rasch, gar nicht jedoch Robison-Ester. Im Methylenblau-Versuch beträgt die Entfärbungszeit z. B. im Durchschnitt 3 Minuten mit, 40 Minuten ohne Flavinenzym-Zugaben. Wagner-Jauregg und Rauen[3]) fanden den Gehalt an Flavinenzym bedeutend höher. Vermutlich sind solche Unterschiede durch das Alter der Bohnen bestimmt.

6. Reine *Cozymase* wurde als weißes Trockenpulver erhalten[4]) und in Lösungen mit 1 mg pro Kubikzentimeter verwendet. Ihre Reinigung braucht nicht unbedingt bis zur letzten Stufe durchgeführt zu werden.

---

[1]) Vgl. Anm. 3, S. 203. [2]) Vgl. Anm. 2, S. 204.
[3]) H. 288, 215 (1935).
[4]) H. v. Euler, H. Albers u. F. Schlenk, H. 240, 113 (1936).

öfters wurde die nach Zerlegung der Phosphorwolframsäure-Fällung erhaltene, i. V. bei 30° eingeengte Lösung verwendet; sie enthält hauptsächlich Codehydrase I, daneben aber auch genügend *Codehydrase II*, so daß sie auch im System der Robison-Ester-Dehydrierung verwendet werden kann.

7. *Robison-Ester* wurde nach der von Warburg und Christian[1]) modifizierten Robisonschen Methode hergestellt und als Bariumsalz isoliert.

8. *Neuberg-Ester* ist aus Candiolin erhältlich[2]). Bei der Überführung des Bariumsalzes in das Kaliumsalz ist ein Überschuß von Kaliumsulfat peinlichst zu vermeiden, da das dehydrierende Fermentsystem durch Sulfationen stark gehemmt wird.

C. Versuche zur Trennung von Fumarat-Hydrase und Flavinenzym.

1. Einwirkung organischer Lösungsmittel.

Schon bei früheren Versuchen[3]) war festgestellt worden, daß Umfällungen der Lösungen roher Fermentpräparate aus Hefe-Macerationssäften mit Aceton und Methanol, wie sie zur Reinigung von Flavinenzym angegeben werden[4]), zu Wirksamkeitsverlusten der Fumarat-Hydrase von 50 Proc. und darüber führen. Auch eine *Behandlung der Fermentlösungen mit Chloroform*, die große Mengen unwirksamen Eiweißes ohne Schädigung des Flavinenzyms entfernt[4]), zerstört den Hauptanteil der Fumarat-Hydrase.

Die Lösungen von gelbem Rohferment wurden mit Chloroform und einigen Tropfen Octanol im Thermostaten bei 36° geschüttelt und vor der Auswertung vom ausgeschiedenen Eiweiß zentrifugiert.

Tabelle 1.

Nr.	Fermentlösung	ccm $CHCl_3$	Versuchsdauer Stdn.	Fumarathydrase-Einheiten	
				vorher	nachher
1	20 ccm 1 : 20	0,25	4	0,50	0,25
2	20 „ 1 : 20	0,50	20	0,50	0,10
3	16 „ 1 : 10	0,40	9	1,00	0,15
4	16 „ 1 : 10	0,80	19	1,00	0,15

[1]) Bio. Z. 254, 439 (1932).
[2]) C. Neuberg, Bio. Z. 88, 432 (1918).
[3]) Vgl. Anm. 3, S. 203.
[4]) Vgl. Anm. 2, S. 204.

Während die Fumarathydrase-Wirksamkeit bis auf 15 Proc. zurückgeht, bleibt jene des Flavinenzyms in allen Versuchen mindestens 90 Proc.

Ähnliche Wirkungen sind bei der *Autolyse der Hefe in Anwesenheit von Essigester* zu beobachten. Aus lebender Hefe durch kurze Behandlung mit Essigester frisch hergestellte Autolysate zeigen zwar eine Fumarathydrase-Wirksamkeit, die auf das Hefe-Trockengewicht bezogen doppelt so groß ist, wie die des Macerationssaftes; sie verlieren aber diese Aktivität in wenigen Stunden. Benutzt man daher zur Darstellung des gelben Rohferments Essigester-Autolysate statt Macerationssäfte, so erhält man Präparate, die das Wirksamkeitsverhältnis Flavinenzym/Fumarat-Hydrase zugunsten des ersteren stark verschoben haben.

1 kg frisch abgepreßter Hefe wurde mit 250 ccm Essigester unter häufigem Umrühren 2 Tage bei Zimmertemperatur belassen. Nach Zugabe von 50 ccm Wasser und weiterem zweitägigem Stehen wurde zentrifugiert und die 270 ccm Saft nach der üblichen Vorschrift durch Fällung mit Bleiessig und Fraktionieren mit Aceton auf gelbes Rohferment weiter verarbeitet. Es wurden jeweils 3 g als erste und zweite Acetonfällung isoliert, also etwa gleichviel wie bei einer Darstellung aus Macerationssaft.

Tabelle 2.

Präparat	Fermenteinheiten		Wirksamkeitsverhältnis FH : FE
	Flavinenzym	Fumarat-Hydrase	
2. Acetonfraktion . .	1,00	0,27	4 : 1
1. Acetonfraktion . .	0,63	0,022	29 : 1

Nach Angaben von E. Adler und Mitarbeitern[1]) soll bei einer derartigen Autolyse das Flavinenzym größtenteils gespalten werden. In unseren Versuchen wurde es jedoch ohne wesentliche Schädigung erhalten, weitgehend von der empfindlicheren Fumarat-Hydrase befreit.

Versucht man eine Reinigung der aus Macerationssäften gewonnenen Rohpräparate durch Alkoholfällung nach der von Haas[2]) für die Darstellung des

Alloxazin-Adenin-Proteids (Methylenblau), Dihydropyridin

[1]) E. Adler, G. Günther u. H. Evereth, H. 255, 29 (1938).
[2]) Bio. Z. 298, 378 (1938).

gegebenen Vorschrift, so wird die Fumarat-Hydrase völlig zerstört. Auch eine bei p_H 7 (statt 4,6 wie Haas angibt) ausgeführte Fällung liefert unwirksame Präparate.

Aus allen diesen Versuchen zur Reinigung mit organischen Lösungsmitteln geht die Verschiedenheit von Flavinenzym und Fumarat-Hydrase hervor, außerdem die viel größere Empfindlichkeit des zweiten Ferments. Es ist daher schwieriger, das Flavinenzym zu entfernen und die Fumarat-Hydrase anzureichern als umgekehrt.

2. Fällungen mit Ammoniumsulfat.

Aus früheren Versuchen[1]) ging hervor, daß durch Ammoniumsulfat-Fällungen sich leicht eine Abtrennung unwirksamer Begleiter von der Fumarat-Hydrase erreichen läßt, nicht aber eine solche des Flavinenzyms. Von wesentlichem Einfluß sind die Acidität der Lösung und die Anwesenheit von Begleitstoffen.

Ausführung der Fällungen. Bei Rohfermentlösungen wurde unter Eiskühlung eine bei Zimmertemperatur gesättigte Salzlösung hinzugegeben; in gereinigten Fermentlösungen wurde hingegen, um eine allzu große Verdünnung zu vermeiden, die erwünschte Sättigungskonzentration durch Einrühren von festem Ammoniumsulfat erreicht. Die Ansätze blieben durchweg vor dem Abzentrifugieren etwa 10 Stunden bei 0° stehen.

Ergebnisse. Bringt man die Lösungen von Fumarathydrase-Präparaten, die durch Adsorption gereinigt sind, mit 1 n-Essigsäure auf p_H 5,2 und setzt Ammoniumsulfat bis zur 66-proc. Sättigungskonzentration zu, so findet man in der überstehenden Lösung keine Fumarat-Hydrase mehr. Die wiederaufgelöste Fällung enthält aber nicht mehr als 50—60 Proc der eingesetzten Wirksamkeit. Bei p_H 7 beginnt das gereinigte Ferment bereits bei 50-proc. Sättigung auszufallen; bei 55-proc. Sättigung lasse sich dann 14 Proc., bei 66-proc. Sättigung 80—85 Proc. des Ferments im Niederschlag nachweisen. Am günstigsten sind die Ergebnisse in Lösungen, deren p_H mit 1 n-Ammoniak auf 9 eingestellt war: man findet bei 66-proc. Sättigung zwischen 93 und 97 Proc. des Ferments im wiederaufgelösten Niederschlag.

Da die Restlösungen in jedem Falle inaktiv sind, läßt sich folgern, daß 66-proc. Sättigung die Fumarat-Hydrase zwar vollständig fällt, daß aber mit wachsender Acidität steigende Fermentverluste auftreten.

[1]) Vgl. Anm. 3, S. 203.

Beim Rohferment braucht man zur Fällung stärkere Sättigungen, wahrscheinlich infolge der Anwesenheit von Polysacchariden, die in den gereinigten Präparaten bei der Adsorption entfernt wurden:

50 Proc. bewirken bei p_H 7 noch keinerlei Fällung; bei 60 Proc. entsteht ein unwirksamer Niederschlag; bei 66 Proc. werden 50 Proc. Fumarat-Hydrase, bei 70 Proc. erst 76 Proc. des Ferments niedergeschlagen; der übrige Fermentanteil ist diesmal aber in den Restlösungen nachweisbar. Ein Sättigungsgrad von 66 Proc. reicht also bei p_H 7 im Gegensatz zu den Versuchen mit gereinigten Lösungen nicht zur vollständigen Fällung der Fumarat-Hydrase aus; eine solche wird jedoch erreicht, wenn bei gleicher Salzkonzentration ein p_H von 5,2 eingestellt wird. Bei dieser Acidität findet man schon bei 60-proc. Sättigung ungefähr 70 Proc. des Ferments im Niederschlag, bei 66-proc. Sättigung 90 Proc.

Das rohe Präparat ist also schwachsauren Ammoniumsulfat-Lösungen gegenüber viel weniger empfindlich als das gereinigte. Erst bei einem p_H von 4,6 zeigen sich auch bei ihm Fermentverluste. Offenbar enthält es die prosthetische Gruppe noch im Überschuß.

Diese Versuche zeigen eine so weitgehende Übereinstimmung der Fällungsverhältnisse der Fumarat-Hydrase mit jenen des Flavinenzyms, die H. Theorell untersucht hat[1]), daß eine Trennung beider Fermente *unter Erhaltung der Fumarat-Hydrase* durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung wenig aussichtsreich erscheint.

Ein Unterschied besteht darin, daß *Flavinenzym von p_H 4,6—9, Fumarat-Hydrase jedoch nur in schwach alkalischem Gebiet ohne Wirksamkeitsverluste sich fällen läßt.* Dieser Unterschied ist bedeutungsvoll, verrät er doch, wie aus den weiter unten geschilderten Versuchen hervorgeht, eine leichtere Dissoziierbarkeit der Wirkungsgruppe der Fumarat-Hydrase.

3. Adsorption an Aluminium-Hydroxyd Cγ.

Zur Abtrennung der Fumarat-Hydrase von begleitenden Polysacchariden sind Adsorptionen besser geeignet als Fällungen. Mit Aluminiumhydroxyd Cγ läßt sich ohne wesentliche Verluste eine Anreicherung der Fumarat-Hydrase auf

[1]) Bio. Z. 278, 263 (1935).

etwa das 10-fache erreichen[1]). Kaolin adsorbiert die Hydrase nicht; Frankonit nur schwach. Auch Granosil eignet sich nicht, obwohl es das Ferment stärker als Flavinenzym aus Lösungen entfernt, weil eine Elution nicht möglich ist.

Zur vergleichenden Prüfung des Verhaltens von Fumarat-Hydrase und Flavinenzym bei der Adsorption an Tonerde wurden folgende Versuchsreihen ausgeführt:

Versuch 1. 10 g Rohferment in 100 ccm Wasser wurden 40 Stunden bei 2° dialysiert (1. Dialyse) und dann an Aluminiumhydroxyd Cγ adsorbiert (2, 5 g in 100 ccm der Suspension, die in drei gleichen Portionen zugegeben wurde). Eluiert wurde 3-mal mit einem Gemisch von sekundärem Ammoniumphosphat und Ammoniak. Die vereinigten Elutionen (1. Elution) wurden nach 48-stündiger Dialyse (2. Dialyse) zum zweiten Mal unter denselben Bedingungen adsorbiert und eluiert (2. Elution). Nach erneuter 40-stündiger Dialyse (3. Dialyse) wurde die Lösung mit Essigsäure auf p_H 5,2 gebracht und 2-mal durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigungskonzentration von 66 Proc. umgefällt. Die wiedergelöste Fällung wurde nach 24-stündiger Dialyse (4. Dialyse) zum dritten Mal adsorbiert und eluiert (3. Elution).

Tabelle 3.

Reinigungsstufe	Lösung ccm	F.-Hydrase-Einheiten pro ccm	Ausbeute in Proc.	
			im ganzen	bezogen auf die vorige Stufe
Ausgangslösung . . .	100	1,00	—	—
1. dialys. Lösung . .	100	0,90	100	100
1. Elution	125	0,73	90	90
2. dialys. Lösung . .	135	0,54	72	80
2. Elution	110	0,48	53	74
3. dialys. Lösung . .	120	0,33	40	75
gelöste Fällungen .	18	0,91	16	40
4. dialys. Lösung . .	22	0,33	7	44
3. Elution	20	0,21	4	57

Die Hauptverluste an Fumarat-Hydrase finden nicht bei den Adsorptionen, sondern bei den Ammoniumsulfat-Fällungen statt, zuletzt bei den Dialysen. Die Verluste an Flavinenzym sind viel geringer.

Dieselbe Folge von Reinigungsoperationen ist von Weygand und Stocker[2]) zur Darstellung des Flavinenzyms durch-

[1]) Vgl. Anm. 3, S. 203.

[2]) H. **247**, 167 (1937).

geführt worden. Sie sollte nach diesen Autoren zu einem 100-proc. reinen Ferment führen. Tatsächlich sind in den Präparaten, die nach dem Adsorptionsverfahren dieser Autoren hergestellt werden, stets, wie in Versuch 1, erhebliche Mengen von Fumarat-Hydrase. Auch ein Original-Präparat, das wir Herrn Dr. Weygand verdanken, zeigte starke Fumarathydrase-Wirkung.

Bei weiteren Adsorptionsversuchen wurde, umgekehrt wie in Versuch 1, eine Verschiebung des Wirksamkeitsverhältnisses zugunsten der Fumarat-Hydrase erstrebt. Die Grundlagen dazu bildeten zwei Beobachtungen: 1. daß die Fumarat-Hydrase aus schwach phosphathaltiger Lösung schwerer adsorbiert wird als das Flavinenzym (Versuch 2), und 2., daß sie mittels ihres Acceptors, mittels Fumarat-Lösungen also, leichter eluiert werden kann (Versuch 3).

Tabelle 4.

Reinigungsstufe	ccm	Fermenteinheiten pro ccm		Wirksamkeitsverhältnis	Fermentausbeuten in Proc.	
		Fumarat-Hydrase	Flavinenzym		Fumarat-Hydrase	Flavinenzym
Ausgangslsg.	250	0,67	0,75	1 : 1	100	100
Lösung 1 . .	340	0,44	0,50	1 : 1	90	90
Lösung 2 . .	350	0,19	0,06	3 : 1	40	12
Lösung 3 . .	265	0,13	0,50	1 : 3,8	20	70
Lösung 4 . .	70	0,18	1,00	1 : 5,4		42
Lösung 5 . .	21	0,018	3,00	1 : 165		34

Versuch 2. 20 g Rohferment werden mit 200 ccm Wasser verrührt und zentrifugiert; der Niederschlag wird mit 50 ccm Wasser nachgewaschen. Zur vollständigen Adsorption der Fumarat-Hydrase sind insgesamt 200 ccm Aluminiumhydroxyd-Aufschlämmung nötig, die in 3 Portionen von 100, 50 und 50 ccm zugegeben werden. Nach jeder Zugabe wird vor dem Zentrifugieren 15 Minuten unter Eiskühlung gerührt. Eluiert wird erst mit 100, dann mit 80, 60 und 50 ccm $^{m}/_{10}$-sek. Natriumphosphat. Die vereinigten Eluate werden bei 2° im Drehdialysator (Beschreibung weiter unten) fast vollständig vom Phosphat befreit (12 Stunden, 20 Liter Außenwasser). Die erhaltene Lösung 1 wird einer zweiten Adsorption unterworfen (60, 30 und 15 ccm Adsorbens). Die Restlösung dieser Adsorption (Lösung 2) enthält noch fast die Hälfte der Fumarat-Hydrase, während der größte Teil des Flavinenzyms schon am Adsorbens haftet. Seine Elution (80, 65, 50 und 30 ccm Phosphat) ergibt eine

Lösung 3, die mit Essigsäure auf p_H 5,2 gebracht und mit Ammoniumsulfat (66-proc. Sättigung) gefällt wird. Im Niederschlag ist das Verhältnis noch weiter zugunsten des Flavinenzyms verschoben, wie sich nach Entfernung des Salzes durch Dialyse zeigt (Lösung 4). Nach 2-maliger Wiederholung der Fällung in gleicher Weise und 6-wöchigem Stehen im Eisschrank trübt sich die salzhaltige Lösung und bildet bei der Dialyse einen starken Niederschlag. Klar zentrifugiert ist diese Lösung 5 stark gelb, praktisch frei von Fumarat-Hydrase, jedoch als Flavinenzym im System der Neuberg-Ester-Dehydrierung sehr aktiv.

Durch Adsorption des Flavinenzyms aus phosphathaltiger Lösung gelingt also eine Anreicherung der Fumarat-Hydrase. Zur vollständigen Adsorption des ersteren Ferments muß jedoch durch eine lang dauernde Dialyse das Phosphat restlos entfernt werden; dabei wird die Fumarat-Hydrase so stark geschädigt, daß sich das Verhältnis wieder umkehrt. Die Befreiung der Fumarat-Hydrase von Flavinenzym kann daher nur beschränkt erfolgen. Der Versuch zeigt aber, wie man umgekehrt zu fumarathydrasefreiem, ziemlich reinem *Flavinenzym* gelangen kann, wobei Ammoniumsulfat-Fällungen in schwachsaurem Gebiet und lange Dialysen wesentlich sind.

Die besten Ergebnisse wurden schließlich erzielt durch *Elution mit Kaliumfumarat-Lösungen*:

Versuch 3. 40 ccm Rohfermentlösung 1 : 10 werden mit Aluminiumhydroxyd Cγ adsorbiert (20, 15 und 10 ccm), und 4-mal mit je 35 ccm $^m/_5$-Kaliumfumarat vom p_H 7,2 eluiert. Die vereinigten, schwach gelben Elutionen (Lösung 1) werden 24 Stunden bei 0° dialysiert (Lösung 2). Aus dieser Lösung wird das Ferment zum zweiten Male mit 25 ccm Aluminiumhydroxyd adsorbiert. Die vereinigten Eluate (Lösung 3, 3-mal je 25 ccm Fumarat-Lösung) werden mit Ammoniak auf p_H 9 gebracht und mit Ammoniumsulfat gefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und in wenig Wasser wieder gelöst (Lösung 4).

Tabelle 5.

Reinigungsstufe	Lösung ccm	Fermenteinheiten pro ccm		Wirksamkeitsverhältnis FH : FE	Ausbeuten in Proc. an Fumarat-Hydrase
		Fumarat-Hydrase	Flavinenzym		
Ausgangslsg.	40	1,00	1,00	1 : 1	—
Lösung 1 . .	150	0,20	0,08	2,5 : 1	75
Lösung 2 . .	150	0,12	0,08	1,8 : 1	45
Lösung 3 . .	75	0,10	0,03	5 : 1	19
Lösung 4 . .	17	0,41	0,07	6 : 1	17

Eine weitere Verbesserung des erzielten Verhältnisses der Wirksamkeiten ist nicht möglich, da sowohl die zur Entfernung des Sulfats erforderliche Dialyse wie weitere Ammoniumsulfat-Fällungen die Fumarat-Hydrase stärker als das Flavinenzym schädigen.

4. Beeinflussungen durch Dialyse.

Nach jeder Adsorption und Elution mußte zur Entfernung anorganischer Salze eine Dialyse eingeschaltet werden. Dabei tritt ein Unterschied im Verhalten der Fumarat-Hydrase und des Flavinenzyms stark hervor: Während das letztere Ferment durchaus beständig ist, verliert die Hydrase ihre Wirksamkeit auch bei Temperaturen, bei welchen sie ohne Dialyse völlig haltbar wäre. Je reiner die Präparate sind, desto schneller ist ihre Zersetzung: Gelbes Rohferment kann bis 48 Stunden in fließendem Wasser ohne jeden Verlust dialysiert werden und beginnt erst am dritten Tag seine Aktivität zu verlieren. Durch Adsorption oder Fällung gereinigte Präparate büßen, namentlich in stark verdünnten Lösungen, ihre Wirksamkeit in 24 Stunden bis auf 5—10 Proc. ein. Bemerkenswerterweise geht dieser Aktivitätsverlust auch nach Unterbrechung der Dialyse weiter und führt im Laufe von 24 Stunden bei 0° zu völliger Inaktivität.

In Wasser lang dialysiertes Rohferment, welches die Fumarathydrase-Aktivität eingebüßt hat, ist als Flavinenzym vollwirksam, trotz Bildung eines starken Niederschlags. In Phosphatlösung tritt keine Ausfällung ein, die Aktivität gegen Fumarat verschwindet aber ebenfalls. Die Zerstörung der Fumarat-Hydrase ist also nicht auf eine Denaturierung von Eiweiß zurückzuführen. Ihre Ursache muß in der Entfernung des dialysierbaren Co-Fermentes zu suchen sein.

Ausführung der Dialysen. Um Fermentzersetzungen durch Wärmewirkungen zu vermeiden, wurden sämtliche Dialysen bei 0—2° ausgeführt, und zwar nach folgenden Methoden: a) Dialyse gegen stehendes destilliertes Wasser bei Ansätzen von 50 ccm und weniger. Die Fermentlösung wird in einem Cellophanschlauch in einem Gefäß mit 10 Liter eiskaltem Wasser eingehängt und im Eisschrank aufbewahrt; b) Dialyse gegen fließendes destilliertes Wasser für größere Ansätze. Als Dialysiergefäße dienen senkrecht stehende Glasrohre von 5—10 cm Durchmesser und

20—30 cm Länge, die unterhalb des oberen Randes und unmittelbar über dem Boden seitliche Rohre zum Wasserabfluß und -zufluß haben. Aus hochstehenden Vorratsflaschen fließt durch ein System von Kühlschlangen in das untere Rohr destilliertes Wasser zu, in 12 Stunden etwa 30 Liter. Dialysiergefäß und Kühlschlangen sind in einem wassergefüllten Bottich mit Eisstücken eingetaucht. Der oben und unten zugebundene Dialysierschlauch von kaum geringerem Durchmesser als das Dialysiergefäß wird elektromotorisch um seine vertikale Achse gedreht. Es kann so bequem über längere Zeiten hinweg eine sehr wirksame Dialyse bei 1—2° durchgeführt werden. c) Die Elektro-Dialyse. In einigen Fällen, besonders wenn es sich darum handelte, Salze möglichst rasch zu entfernen, wurde auch im Apparat von Pauli[1]) elektro-dialysiert, und zwar bei einer Spannung von 220 Volt und einer Stromstärke von 10—20 Milliampère. Das ganze Gerät wurde durch Eintauchen in eine Eis-Wasser-Mischung gekühlt. Sobald die Salze entfernt sind, verliert die Fumarat-Hydrase besonders schnell ihre Aktivität.

Durch Kombination der für die Fumarat-Hydrase schädlichen Behandlungen (Essigester-Autolyse, Ammonsulfat-Fällungen in schwach saurem Gebiet, lang-dauernde Dialysen) gelingt es leicht, ein zwar nicht sehr reines, aber *von der Fumarat-Hydrase völlig freies Flavinenzym herzustellen.* Dazu dienten zweckmäßig die aus Essigester-Autolysaten erhaltenen Rohfermentpräparate, die schon sehr arm an Fumarat-Hydrase sind.

4,5 g eines solchen Präparates z. B. werden in 45 ccm Wasser 72 Stunden im Drehdialysator dialysiert. Die klar zentrifugierte Lösung wird mit Essigsäure auf p_H 5,2 gebracht und mit Ammoniumsulfat bis zur 66-proc. Sättigung gefällt. Der Niederschlag wird nach 12 Stunden in 20 ccm Wasser gelöst und nochmals 48 Stunden dialysiert. Nach erneuter Ammoniumsulfat-Fällung, Auflösung des Niederschlags und einer letzten 24-stündigen Dialyse enthält die Lösung auf 1,00 Einheit Flavinenzym nur noch $1{,}8 \cdot 10^{-3}$ Einheiten Fumarat-Hydrase. Das Wirksamkeitsverhältnis ist also 550 : 1; die Ausbeute an Flavinenzym beträgt 40 Proc.

5. Elektrophoretische Trennungen.

Aus den Versuchen der vorhergehenden Abschnitte geht hervor, daß die Reinigung der Fumarat-Hydrase sehr erschwert wird durch ihre Ähnlichkeit mit dem Flavinenzym, vor allem aber durch ihre Empfindlichkeit, die auf eine Dissoziation ihrer prosthetischen Gruppe zurückgehen muß.

[1]) W. Pauli, Bio. Z. **152**, 355 (1924).

Daher wurde als wirksamste Methode zur Trennung von Kolloiden die Elektrophorese herangezogen. Für die Reinigung und präparative Herstellung von Flavinenzym ist sie von H. Theorell untersucht und genau diskutiert worden[1]). In unseren Versuchen kam es vor allem auf eine Prüfung des Verhaltens der Fumarat-Hydrase im Vergleich zu dem des Flavinenzyms und auf eine Trennung der beiden Fermente an.

Apparatur und Versuchsanordnung.

Verwendet wurde nach einigen präparativen Versuchen im großen Kataphoreseapparat nach Theorell[2]) die von Meyerhoff und Möhle[3]) veränderte Ausführung der kleinen Theorellschen Apparatur. Der Aufbau der Glaszellen erfolgt, anders als bei den genannten Autoren, derart, daß die mit seitlichen Ansätzen versehenen Glasringe nicht in der Mitte des U-Rohres, sondern unmittelbar über dem U-förmigen Verbindungsstück eingesetzt werden. Das U-Rohr wird dann bis zum oberen Rand der Zellen 6 + und 6 − mit der Fermentlösung beschickt und im übrigen mit Pufferlösung aufgefüllt. Es wird so eine Ersparnis an Ausgangsmaterial und eine Verfeinerung der Trennungsmöglichkeit durch Verlängerung des Wanderungsweges erreicht. Alle Versuche wurden in einem Eis-Thermostaten bei 0° ausgeführt. Leitfähigkeit und p_H-Werte der Ferment- und Pufferlösungen müssen recht genau übereinstimmen. Die Leitfähigkeit wurde mit einer Genauigkeit von 0,7 Proc. bestimmt, der p_H-Wert potentiometrisch mit der Chinhydronelektrode auf ± 0,01 Einheiten.

Ausgangsmaterial für alle Versuche war das gelbe Rohferment. Die Leitfähigkeit einer Lösung 1 : 10 dieses Präparates in reinem Wasser beträgt $\varkappa = 2{,}0 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm, bei einer Lösung 1 : 20 ist $\varkappa = 1{,}2 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm. Da noch Puffersalze hinzugefügt werden müssen, wird zur Verminderung der Leitfähigkeit die Rohfermentlösung vor dem Versuch einer kurzen Elektrodialyse unterworfen, die das Ferment nicht schädigt und in 70 Minuten ein Absinken ihrer Eigenleitfähigkeit um $0{,}5 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm bewirkt.

Zur Einstellung von Fermentlösung und Pufferlösung auf gleiche Leitfähigkeit und gleichen p_H-Wert wird eine Pufferlösung von gewünschtem p_H-Wert mit einer Leitfähigkeit von $3—4 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm hergestellt. Die Rohfermentlösung 1 : 10 wird dann mit dieser Pufferlösung auf 1 : 20 verdünnt. Dann wird die Pufferlösung so lange verdünnt, bis ihre Leitfähigkeit auf den Wert der Fermentlösung herabgesunken ist. Als zulässig wurden noch eine Abweichung der Leitfähigkeit um 1 Proc. und eine Differenz der p_H-Werte um 0,03 Einheiten betrachtet.

---

[1]) Vgl. Anm. 1, S. 211.

[2]) Bio. Z. 278, 291 (1935).

[3]) Bio. Z. 294, 249 (1937).

Vorversuche über p_H-Beständigkeit. Die Wirksamkeit der gereinigten Fumarat-Hydrase bleibt in Pufferlösungen bei 0° im p_H-Bereich 5,2—9 mindestens 3 Tage voll erhalten. Unterhalb p_H 5,2 nimmt die Wirksamkeit des Ferments jedoch rasch ab, z. B. nach 7 Stunden und bei p_H 4,6 auf 33 Proc. In starker Verdünnung sind auch Rohpräparate der Fumarat-Hydrase, sowie die gereinigten, erheblich empfindlicher. Eine Rohfermentlösung 1 : 60 in Acetatpuffer vom p_H 5,2 ist nach 24 Stunden bei 0° zur Hälfte inaktiviert. Mit Rücksicht auf die Inaktivierung der Fumarat-Hydrase in saurer Lösung wurden Kataphoresen von gelbem Rohferment nur im p_H-Bereich von 5,2—8,5 durchgeführt. Versuche bei p_H 4,6, die mit Flavinenzym erfolgreich sind, scheiden von vornherein aus; selbst bei p_H 5,2 hat man schon mit Verlusten an Fumarat-Hydrase zu rechnen.

Beispiele einiger Versuchsdaten und Ergebnisse.

Versuch 1.

Anfangsgrenzschicht zwischen den Zellen 5 und 6. Fermentlösung und Acetatpufferlösung: $p_H = 5{,}24$; $\varkappa = 3{,}64 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm.
Spannung 120 Volt; Stromstärke 12 Milliampère; Zeit 10 Stunden.

Tabelle 6.

Lösung	Vol. in ccm	Fermenteinheiten			
		Fumarat-Hydrase		Flavinenzym	
		pro ccm	im ganzen	pro ccm	im ganzen
Ausgangslösung	31,5	0,44	13,86	0,40	12,60
U-Stück . . .	27,5	0,25	6,60	0,40	8,25
Zelle 6+ . . .	2,0	0,24	0,48	0,40	0,80
Zelle 5+ . . .	2,0	0,26	0,52	0,40	0,80
Zelle 4+ . . .	2,0	0,27	0,54	0,40	0,80
Zelle 3+ . . .	2,0	0,20	0,40	0,40	0,80
Zelle 2+ . . .	2,0	0,12	0,24	0,05	0,10
Zelle 1+ . . .	2,0	—	—	—	—
			8,88		11,50
			Verlust 36 %		Verlust 9 %

Ein weiterer Versuch bei p_H 5,22 hatte entsprechende Ergebnisse. Die Verluste an Fumarat-Hydrase sind auf die Dissoziation der prosthetischen Gruppe in der schwachsauren Lösung zurückzuführen; es trat nicht die geringste Trübung ein.

Bei p_H 5,24 findet also eine langsame anodische Wanderung beider Fermente statt; man erkennt, daß sie mit scharfen Grenzflächen und ohne Konzentrationsänderungen verlaufen ist. Die Wanderungsgeschwindigkeiten der zwei Fermente sind kaum verschieden. Die Fumarat-Hydrase hat 3,5 cm,

das Flavinenzym 3,1 cm zurückgelegt. In Zelle 2+ ist daher das Verhältnis auf 2 : 1 zugunsten der Fumarat-Hydrase verschoben.

Theorell hat den isoelektrischen Punkt des Flavinenzyms bei p_H 5,25 ± 0,03 bestimmt. Jener der Fumarat-Hydrase kann sich um höchstens 0,01 Einheiten davon unterscheiden.

Die Kataphorese in der Nähe des isoelektrischen Punktes (4,6—7,0) bewirkt also keine zureichende Trennung von Flavinenzym und Fumarat-Hydrase. Die von uns durch Elektrophorese in diesem p_H-Bereich dargestellten Flavinenzym-Präparate enthielten stets noch Fumarat-Hydrase. Auch ein Gelbes Ferment-Präparat „elektrophoretisch gereinigt", welches uns freundlicherweise von Herrn H. Theorell zur Verfügung gestellt wurde, zeigte starke Fumarat-Hydrase-Wirkung.

In einem weiteren Versuch, auf dessen Wiedergabe im einzelnen verzichtet wird, waren die Bedingungen gleich, nur daß Fermentlösung und Phosphatpufferlösung ein p_H von 6,87 hatten. Der Unterschied in den Wanderungsgeschwindigkeiten der beiden Fermente hatte sich gegenüber dem von Versuch 1 verstärkt, der Verlust an Fumarat-Hydrase betrug nur 8 Proc. und in Zelle 5 + war das Wirksamkeitsverhältnis etwa 2 : 1.

Versuch 2.

Anfangsgrenzschicht zwischen den Zellen 5 und 6. Fermentlösung und Boratpufferlösung: $p_H = 8{,}41$; $\varkappa = 1{,}55 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm.
240 Volt; 10 Milliampère; 3,5 Stunden.

Tabelle 7.

Lösung	Vol. in ccm	Fermenteinheiten			
		Fumarat-Hydrase		Flavinenzym	
		pro ccm	im ganzen	pro ccm	im ganzen
Ausgangslösung	31,5	0,49	15,44	0,30	9,45
U-Stück . . .	27,5	0,41	11,28	0,27	7,43
Zelle 6+ . . .	2,0	0,47	0,94	0,27	0,54
Zelle 5+ . . .	2,0	0,33	0,66	0,23	0,46
Zelle 4+ . . .	2,0	0,32	0,64	0,15	0,30
Zelle 3+ . . .	2,0	0,33	0,66	0,15	0,30
Zelle 2+ . . .	2,0	0,32	0,64	0,15	0,30
Zelle 1+ . . .	2,0	0,32	0,64	0,05	0,10
			15,46 kein Verlust		9,43 kein Verlust

Bei diesem p_H-Wert treten keine Wirksamkeitsverluste der Fumarat-Hydrase ein; der Unterschied in den Wanderungsgeschwindigkeiten beider Fermente ist so groß (1,3 : 1), daß in Zelle 1+ sich das Wirksamkeitsverhältnis bis auf 6 : 1 zugunsten der Hydrase verschoben hat. Aus der Konstanz der Fumarathydrase-Werte in den Zellen 1+ bis 5+ ergibt sich, daß das Ferment mit scharfer Grenzfläche und ohne Konzentrationsänderung gewandert ist. Der Gehalt an Flavinenzym ist in den Zellen 4+, 3+ und 2+ konstant, aber nur noch etwa halb so groß wie in den vorhergehenden Kammern. *Daraus kann man schließen, daß das Flavinenzym im verwendeten Fermentpräparate nicht einheitlich ist, sondern aus zwei Komponenten besteht*, die beide im System der Neuberg-Ester-Dehydrierung wirksam sind, aber im alkalischen Gebiet eine verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit haben. Da die eine Komponente fast ebenso rasch wie die Fumarat-Hydrase wandert, handelt es sich bei ihr möglicherweise um das Alloxazin-Adenin-Proteid von E. Haas[1]), während die langsamer wandernde Komponente das „alte" Alloxazin-Proteid darstellen wird.

Für die *Fumarat-Hydrase* ergibt sich aus den Versuchsdaten, da ihr Weg 3,3 cm beträgt, eine *Ionenbeweglichkeit* $= +0{,}89 \cdot 10^{-4} \frac{\text{qcm}}{\text{Volt} \cdot \text{Sek.}}$.

In den folgenden Versuchen wurde, um eine bessere Trennung zu erreichen, die Fermentlösung auf der kathodischen Seite des U-Rohres und zwar in die Zellen 1 — bis 5 — eingeführt. In alle übrigen Zellen und das U-Verbindungsstück wurde die Pufferlösung gegeben. Die spezifisch schwerere Fermentlösung sinkt dann allerdings in kurzer Zeit bis in die Mitte des U-Rohres hinab, wobei sie sich stark verdünnt. Trotzdem wird die zur Wanderung verfügbare Wegstrecke auf etwa das 3-fache verlängert.

Versuch 3.

Fermentlösung und Boratpufferung: $p_H = 8{,}50$; $\varkappa = 3{,}40 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm. 200 Volt; 14 Milliampère; 13 Stunden.

[1]) Vgl. Anm. 2, S 209.

Tabelle 8.

Lösung	Vol. in ccm	Fermenteinheiten			
		Fumarat-Hydrase		Flavinenzym	
		pro ccm	im ganzen	pro ccm	im ganzen
Ausgangslösung	10,0	1,13	11,30	0,90	9,0
U-Stück . . .	27,5	0,37	10,17	0,30	8,25
Zelle 6 + . . .	2,0	0,33	0,66	0,29	0,58
Zelle 5 + . . .	2,0	0,33	0,66	0,10	0,20
Zelle 4 + . . .	2,0	0,21	0,44	0,01	0,02
Zelle 3 + . . .	2,0	—	—		—
			11,93		9,05
			kein Verlust		kein Verlust

In Zelle 4 + ist bei relativ hoher Aktivität der *Fumarat-Hydrase* eine *Verschiebung des Verhältnisses ihrer Wirksamkeit zu der des Flavinenzyms auf 20 : 1* eingetreten. Dieses Verhältnis stellt den besten der bisher erreichten Werte dar.

In einem gleichartig durchgeführten Versuch wurde durch Fällung mit Trichloressigsäure und nephelometrischer Bestimmung die Eiweißkonzentration in der Zelle mit starker Fumarathydrase- und geringer Flavinenzym-Wirksamkeit bestimmt. *Es ergibt sich dem Rohferment gegenüber eine Anreicherung der Hydrase auf etwa das 20-fache, der Trockenhefe gegenüber auf etwa das 500-fache.*

II. Co-Ferment und Aktivator der Fumarat-Hydrase.

Die auffallenden, in den vorhergehenden Abschnitten vermerkten Erscheinungen der Inaktivierung der Fumarat-Hydrase bei der Dialyse und den Fällungen hatten schon früh die Vermutung nahegelegt, daß dieses Ferment — und die α,β-ungesättigte Alkohole hydrierende „Äthylen-Hydrase" — eine dissoziierende prosthetische Gruppe enthalten. Durch Adsorptionen mit Tierkohle war es auch gelungen, starke Wirksamkeitsverminderungen zu bewirken, die durch Zugabe von Lactoflavinphosphat wieder behoben werden konnten. Daraus war Ende 1937 der Schluß gezogen worden[1]), daß Fumarat-

[1]) F. G. Fischer und A. Roedig, Vortrag am 20. Dezember 1937 im Colloquium des Kaiser-Wilhelm-Institutes für Medizinische Forschung in Heidelberg, Z. Angew. 51, 82 (1938).

Hydrase ein Lactoflavinphosphat enthaltendes gelbes Ferment sei. Es war die erste bekanntgegebene Feststellung, daß es außer dem von Warburg und Christian 1932 entdeckten[1]), von Theorell 1935[2]) näher untersuchten Ferment, welches den Wasserstoff von den Dihydro-Codehydrasen übernehmen und an Sauerstoff oder Methylenblau abgeben kann, noch andere gelbe Fermente gibt.

Die völlige Spaltung der Fumarat-Hydrase in Protein und prosthetische Gruppe und die Erkennung dieser als Alloxazin-Adenin-Dinucleotid gelang aber erst[3]), nachdem Warburg und Christian[4]) am Beispiel der d-Aminosäuren-Dehydrase die Spaltungsmethode der Fällung mit Ammoniumsulfat in saurer Lösung mitgeteilt und die Gewinnung des Dinucleotids beschrieben hatten.

Die Wirkung des Lactoflavinphosphats ist in weiteren, im übernächsten Abschnitt erwähnten Versuchen geklärt worden.

A. Spaltung und Rekombination.

1. Fällung der Protein-Komponente.

Die Proteinlösung wird, mit geringen Abänderungen der Warburgschen Vorschrift, durch 3-malige Behandlung mit saurem Ammoniumsulfat erhalten. 30 ccm Rohferment 1 : 10 werden unter Eiskühlung mit soviel bei Zimmertemperatur gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, daß eben eine Trübung aufzutreten beginnt (30 ccm; Sättigungsgrad 50 Proc.). Dann kühlt man auf -5^0 ab und gibt unter starkem Rühren tropfenweise eine eiskalte Mischung von 2 Teilen gesättigter Ammoniumsulfatlösung mit 1 Teil 1 n-Salzsäure zu, wobei die anfängliche Trübung sich schließlich zu einem dicken Niederschlag verstärkt hat. Nach dem Zusatz von 25—30 ccm wird Kongopapier deutlich gebläut (Sättigungsgrad etwa 55 Proc.). Man läßt unter gelegentlichem Umrühren $^1/_2$ Stunde bei -5^0 stehen (wesentlich!) und zentrifugiert bei 0^0 mit 15000 U/Min. ab. Die Lösung wird durch Zusatz von festem Natriumbicarbonat neutralisiert und zu den Rekombinationsversuchen verwendet (Restlösung). Der Rückstand wird mit 20 ccm 66-proc. kalt gesättigter Ammoniumsulfatlösung nachgewaschen, zentrifugiert und dann in $^m/_5$-Phosphatpuffer vom p_H 7 auf 28 ccm gelöst (Proteinlösung A). Nach 1-maliger Behandlung mit saurer Ammoniumsulfat-Lösung ist die Inaktivierung der

[1]) Vgl. Anm. 2, S. 204. [2]) Vgl. Anm. 1, S. 211.
[3]) Kurz mitgeteilt Naturwiss. 27, 197 (1939).
[4]) Bio. Z. 298, 150 (1938).

Fumarat-Hydrase noch lange nicht vollständig (20—40 Proc. vom Anfangswert). Die Fällung wird daher unter den gleichen Bedingungen wiederholt, wobei man dem geringeren Volumen der Ausgangslösung entsprechend die Zusätze bemißt, so daß wieder eine Sättigung von 55 Proc. erreicht wird. Der Niederschlag wird nach dem Auswaschen auf 25 ccm gelöst (Proteinlösung B). Die Fumarat-Hydrase-Aktivität beträgt dann nur noch 5 Proc. der Rohfermentlösung. Führt man die saure Ammoniumsulfatfällung hierauf zum 3. Male durch, wobei sich der entstandene Niederschlag fast rückstandslos löst, so erhält man eine farblose, schwach opalescierende Lösung, in der nicht mehr als 1 Proc. der anfänglichen Wirksamkeit nachweisbar ist (Proteinlösung C).

Die Ausbeute an kupplungsfähigem Protein beträgt nach 3-maliger Umfällung 50 Proc., nach 1-maliger über 90 Proc., wie sich aus dem Vergleich der Wirksamkeiten der Fermentlösungen vor der Spaltung und nach der Rekombination mit zureichenden Mengen Dinucleotid ergibt.

Im Kühlschrank ist die Protein-Fällung wochenlang unverändert haltbar.

2. Rekombination.

Bei den Spaltungsversuchen fiel auf, daß die zunächst geringe Wirksamkeit von partiell inaktivierten Protein-Niederschlägen jedesmal im Laufe einiger Stunden auf etwa das Doppelte wieder anstieg. Das deutete darauf hin, daß die Niederschläge noch abgespaltenes Co-Ferment enthielten, welches sich in *langsamer* Reaktion mit der Proteinkomponente zum wirksamen Ferment verband. Tatsächlich zeigte sich auch beim Zusatz der bei der Spaltung erhaltenen Restlösung anfänglich nur eine sehr geringe Aktivierung, die sich aber im Laufe von 4—6 Stunden bei 0° bis auf den ursprünglichen Wert der zum Spaltungsversuch verwendeten Fermentlösung verstärkte. Die gleiche Erscheinung wurde auch nach Zugabe von *Alloxazin-Adenin-Dinucleotid* zu dem inaktiven Fermentprotein beobachtet. Im Gegensatz dazu bedarf die mit Lactoflavin (LF) erreichbare Reaktivierung keiner Inkubationszeit.

Tabelle 9.

Inkubationszeit	Ohne Zusätze	0,4 ccm Restlösung	10 γ LF	10 γ LF + 0,4 ccm Restlös.
Keine	9′	3′ 10″	2′ 50″	—
1 Stunde	6′	1′ 30″	—	—
3 Stunden	4′ 46″	—	—	—
20 Stunden	5′	1′ 15″	2′ 57″	55″

Die Zahlen geben die Zeiten der 10—50-proc. Leuko-methylenviolett-Reoxydation in einem Versuch mit partiell inaktiviertem Ferment (Proteinlösung A).

Die Rekombination von gefälltem Protein und prosthetischer Gruppe ist eine langsam verlaufende Reaktion.

Vor Bestimmung der wiedererzeugten Fermentaktivität im Methylenviolett-Versuch müssen daher die Protein- und Co-Ferment-Lösungen nach dem Mischen bei 0° mindestens 4 Stunden stehen.

Geprüft wurde die Reaktivierung der Protein-Lösung mit *Rohferment-Kochsäften*, mit *Codehydrase I* und *II*, mit der bei der sauren Salzfällung erhaltenen *Restlösung*, mit *Lactoflavin* und *Lactoflavinphosphat* (synthetische Präparate) und mit *Alloxazin-Adenin-Dinucleotid* [nach Warburg und Christian[1]) aus Hefe als Bariumsalz rein dargestellt].

Nach Zugabe der beiden Codehydrasen tritt erwartungsgemäß keine Fermentwirksamkeit auf. Kochsäfte aktivieren, bei Verwendung entsprechender Mengen, nur unvollständig, die Restlösung jedoch bis nahe zu dem ursprünglichen Wert. Lactoflavin und Lactoflavinphosphat, in Mengen zugesetzt, die der gelben Farbe der ursprünglichen Fermentlösung entsprechen, beschleunigen die Wirkung der Protein-Komponente nur dann stark, wenn diese nicht ganz von der prosthetischen Gruppe befreit worden ist. Darauf soll weiter unten noch eingegangen werden.

Die *Wirkung von Alloxazin-Adenin-Dinucleotid* (AADN), *im Vergleich mit jener von Lactoflavinphosphat* (LFP) *und kombiniert mit Lactoflavinphosphat* ist aus folgendem Versuch zu erkennen:

Verwendet wurden jeweils 0,2 ccm der Proteinlösung C, die 14 Stunden bei 0°, mit 0,1 ccm der Zusätze gemischt, gestanden hatte. Angegeben sind die Zeiten einer 10—50-proc. Leuko-Methylenviolett-Reoxydation.

Die Zugabe von Dinucleotid (in der zur Erzielung einer maximalen Geschwindigkeit zureichenden Menge) plus Restlösung führt keine höhere Aktivität herbei als die von

[1]) Vgl. Anm. 4, S. 222.

Dinucleotid allein. *Die Restlösung enthält also außer dem Dinucleotid keine weitere Komponente, die zur Aktivierung des Fumarathydrase-Proteins befähigt ist.*

Tabelle 10.

Menge der Zusätze in γ	AADN	LFP	25 γ LFP + AADN
0,0000	120′	120′	120′
0,0004	65′	—	18′ 30″
0,0008	43′	—	—
0,004	26′	—	9′ 30″
0,008	12′	—	4′ 30″
0,04	5′ 30	—	—
0,08	3′ 45″	—	2′ 17″
0,1	—	110′	—
0,4	3′ 15″	—	1′ 53″
0,5	—	102′	—
0,8	2′ 32″	—	1′ 34″
1,0	—	90′	—
4,0	1′ 50″	—	1′ 5″
5,0	—	56′	—
8,0	1′ 30″	—	50″
10,0	—	50′	—
25,0	—	51′	—
50,0	—	53′	—
100,0	—	49′	—

Bei der Untersuchung des „alten" gelben Ferments fand Theorell[1]), daß bei Zugabe der Wirkungsgruppe die Wiedervereinigung augenblicklich eintritt und daß die Fermentwirksamkeit proportional den Zusätzen ansteigt. Ein Mol Lactoflavinphosphat wird von einem Mol Ferment-Protein gebunden. Darüber hinaus bewirkt ein noch so großer Überschuß an prosthetischer Gruppe keine meßbare Erhöhung der Wirksamkeit mehr. Auch das „neue" gelbe Ferment von E. Haas[2]) und die Cytochrom c-Reduktase dieses Autors[3]) sind nur äußerst schwach dissoziiert. Im Gegensatz dazu, und mehr der d-Aminosäuren-Dehydrase ähnlich, *ist die Disso-*

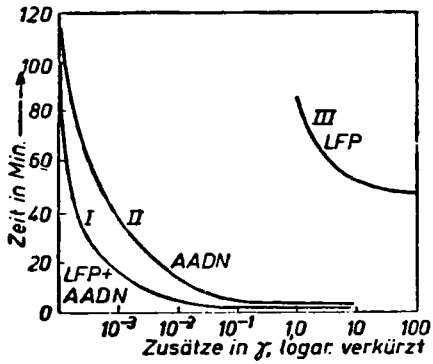
[1]) Vgl. Anm. 1, S. 211.

[2]) Vgl. Anm. 2, S. 209.

[3]) E. Haas, B. L. Horecker und T. R. Hogness, J. biol. Chem. **136**, 747 (1940).

ziation der Fumarathydrase in Protein und Wirkungsgruppe beträchtlich, wie die Figur veranschaulicht (Kurve II).

Dadurch und durch die Erscheinung, daß Spaltung und Rekombination *langsam* verlaufende Reaktionen sind, werden zahlreiche, bei der Fermentreinigung gemachte Erfahrungen verständlich: Die Wirksamkeitsverluste bei Fällungen mit organischen Lösungsmitteln und mit Ammoniumsulfat, die Inaktivierungen bei der Dialyse, welche bei adsorbierten, an Wirkungsgruppe ärmeren Präparaten am schnellsten erfolgen, und ähnliches mehr. Eine Abnahme der Dissoziation mit steigendem p_H dürfte die optimale Stabilität der Fumarat-Hydrase in schwach alkalischem Medium bedingen, wie sie bei Salzfällungen und der Kataphorese beobachtet wurde.



Bei sehr kleiner Konzentration des Alloxazin-Adenin-Dinucleotids kann man annehmen, daß seine Bindung an das überschüssige Ferment-Protein nahezu vollständig ist und seine *Leistung als Überträger* unter den gewählten Versuchsbedingungen schätzen: $4 \cdot 10^{-4}\,\gamma$ Dinucleotid, entsprechend $4{,}4 \cdot 10^{-13}$ Molen, bewirken z. B. die Reoxydation von $8 \cdot 10^{-8}$ Molen Leuko-Methylenviolett in 65 Minuten, oder von $1{,}2 \cdot 10^{-9}$ Molen pro Minute. *1 Mol Dinucleotid überträgt also in der Minute 2800 Mole Wasserstoff vom Leuko-Farbstoff auf Fumarsäure.* Für das Dinucleotid im System der Aminosäuren-Dehydrierung haben Warburg und Christian[1]) eine Wir-

[1]) Vgl. Anm. 4, S. 222.

kungsstärke von 1440 Molen „übertragenen Sauerstoffs" pro Minute berechnet.

B. Aktivierung mit Lactoflavin und Lactoflavinphosphat.

Die Beobachtung, daß durch Dialysen und Adsorptionen die Wirksamkeit der Fumarat-Hydrase stark sinken kann, hatte schon früh zur weiteren Beobachtung der Wirksamkeitssteigerung durch Lactoflavinphosphat geführt. Zuerst untersucht wurde sie an Fermentpräparaten, die durch *Adsorption an Tierkohle* inaktiviert worden waren.

Beispiel: Nach dem Absaugen von 10 ccm einer Rohfermentlösung 1 : 10, die $^1/_2$ Stunde bei 0° mit 0,5 g Tierkohle gerührt worden war, bildet das Filtrat eine hellgelbe, durch feinste Kohleteilchen noch getrübte Lösung. Durch 1-stündiges Zentrifugieren (5000 U./Min.) bilden sich 2 scharf gegeneinander abgesetzte Schichten, die obere farblos, die untere tiefgelb. Die farblose Schicht enthält fast gar keine Fumarat-Wirksamkeit (weniger als 10 Proc. der ursprünglichen), die gelbe ist sehr aktiv.

Durch Ferment-Kochsäfte oder durch Dinucleotid-Gaben läßt sich eine *Reaktivierung* der an Co-Ferment verarmten, farblosen Schicht bis zur Wirksamkeit der ursprünglichen Lösung herbeiführen. Um mit Lactoflavinphosphat jedoch ähnliche Aktivitäten zu erreichen, müssen Mengen zugesetzt werden, wie sie nach colorimetrischen Messungen in der Lösung vor der Adsorption nicht enthalten sein können.

Bei weiteren Versuchen zeigt es sich, daß auch die Wirksamkeit von Fermentlösungen, die von vornherein oder durch Dinucleotid-Zugabe genügend Co-Ferment enthielten, durch *Lactoflavinphosphat* gesteigert werden kann. Dieselbe, in äquivalenten Konzentrationen gleichstarke Wirkung wird auch von *Lactoflavin* ausgeübt.

In folgendem Versuch wurde gleichzeitig geprüft, ob Versuchsansätze mit *katalytisch* reduziertem Methylenviolett gleiche Zeiten ergeben, wie solche, in denen der Farbstoff üblicherweise mit Hyposulfit reduziert worden war. Denn es erschien möglich, daß die beschleunigende Wirkung des Flavins auf einem Schutz des Ferments vor dem unvermeidlichen, kleinen Hyposulfit-Überschuß beruhen würde [über die Schädigung der Fumarat-Hydrase durch Hyposulfit vgl.[1])].

[1]) Vgl. Anm. 3, S. 203.

Pro Rohr wurden 0,2 ccm Fermentlösung mit und ohne Zusatz von 10 γ Lactoflavin (LF) verwendet.

Tabelle 11.

Fermentlösung	Katalytischer Versuch		Hyposulfitversuch	
	ohne LF	mit LF	ohne LF	mit LF
Rohferment 1 : 10	1′ 8″	34″	1′ 20″	40″
Durch Dialyse abgeschwächtes Ferment . .	15′ 40″	3′ 48″	14′	3′ 45″

Der Betrag der stöchiometrischen, sofortigen Wiederfärbung des Leuko-Methylenvioletts durch das Flavin ist sinngemäß in Abzug gebracht.

Durch Hyposulfit wird also keine Fermentschädigung verursacht; die Beschleunigung durch Lactoflavin äußert sich in beiden Reihen gleich.

Aus den Werten von Tabelle 10 und der Figur ist weiterhin erkenntlich, wie sich die Aktivierung von Dinucleotidfreiem Ferment-Protein (Kurve III) und von rekombiniertem Ferment (Kurve I) durch Lactoflavinphosphat äußert. Die auffallendste Steigerung wird erreicht, wenn eine zur Entfaltung der vollen Fermentaktivität unzureichende Menge Dinucleotid vorhanden ist.

Diese Beschleunigung wird verständlich durch die größere Geschwindigkeit der fermentativen *Oxydoreduktion zwischen Leuko-Lactoflavin und Fumarat.* Die Umsetzung

Lactoflavin + Leuko-Methylenviolett = Leuko-Lactoflavin + Methylenviolett

verläuft ja augenblicklich.

In dem üblichen Ansatz wurde die Methylenviolett-Lösung durch eine mit $^{m}/_{5}$-Phosphat auf p_H 7 gepufferte Lösung von 100 γ Lactoflavin pro Kubikzentimeter ersetzt ($^{m}/_{5000}$ M). 0,2 ccm einer Rohfermentlösung 1 : 10 benötigen zur vollständigen Reoxydation des Flavins nach sechs übereinstimmenden Versuchen 60 Sekunden, zur völligen Wiederfärbung eines gleichen Volumens $^{m}/_{5000}$ Leuko-Methylenviolett aber etwa 4 Minuten.

Die Aktivierung der Fumarathydrase-Wirkung durch Lactoflavin und sein Phosphat kommt dadurch zustande, daß sich die Oxydoreduktionen dieser Stoffe beschleunigend zwischen der von Leuko-Farbstoff und Ferment einschalten.

Die Reaktion mit Leuko-Lactoflavin verläuft viermal rascher als die mit Leuko-Methylenviolett. Auf Grund der Redox-Potentiale (E_0' bei Lactoflavin = − 0,185 V, bei Methylenviolett = − 0,256 V) wäre eher das Umgekehrte zu erwarten. Andere Leukofarbstoffe mit einem höheren Potential als −0,20 V werden nämlich nur außerordentlich langsam dehydriert, Leuko-Nilblau z. B. (E_0' = − 0,15 V) etwa 30-mal langsamer als Leuko-Methylenviolett[1]). Für die schnellere fermentative Dehydrierung des Leuko-Lactoflavins müssen daher andere Faktoren als das Potential maßgebend sein.

Für die Rolle des Lactoflavins als natürlicher Wasserstoffüberträger in Reaktionen mit gelben Fermenten dürfte diese Beobachtung aufschlußreich sein.

Von K. Laki[2]) ist mitgeteilt worden, daß Succino-Dehydrase die Oxydoreduktion zwischen Fumarat und der reduzierten Stufe des Flavinenzyms katalysieren könne. Daraus zog I. Banga[3]) den Schluß, daß Flavinenzym im Cyclus der C_4-Dicarbonsäuren die Wasserstoffverschiebung zwischen der mit Äpfelsäure aktivierten Malicodehydrase und der mit Fumarsäure aktivierten Succino-Dehydrase bewirke. Diese Schlußfolgerung ist abgeleitet worden aus einem Versuch mit Succino-Dehydrase aus Tauben-Brustmuskel und gelbem Rohferment aus Hefe, das nach unsereren Erfahrungen sicherlich Fumarat-Hydrase enthielt.

Versuch mit fumarathydrasefreiem Flavinenzym.

Für die Succino-Dehydrase-Wirkung dienten frischer und kalt getrockneter Tauben-Brustmuskel (vgl. S. 237). Phosphatpuffer p_H 7. Je Thunberg-Rohr: 0,1 ccm $^m/_{10}$-Fumarat, 1,0 ccm $^m/_{5000}$-Methylenviolett oder 1,0 ccm $^m/_{5000}$-Lactoflavin oder 3,0 ccm Flavinenzym gleicher Farbstärke (Herstellung S. 216).

---

[1]) Nach G. Barron, J. biol. Ch. **97**, 287 (1932), besteht auch bei der Autoxydation einer Anzahl von Dihydro-Farbstoffen eine direkte Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Normalpotential.

[2]) H. **249**, 61 (1937). [3]) H. **249**, 205 (1937).

Fermentpräparate	100-proc. Reoxydation v. Leuko-LF	10—50-proc. Reoxydation v. Leuko-MV	Vollständige Färbung von Leuko-Flavinenzym
0,04 g frischer Muskel . .	16—20′	30″	keine
0,01 g getrockneter Muskel	30—40′	1′ 30″	keine

Leuko-Flavinenzym wird also von Fumarat + Succino-Dehydrase nicht dehydriert. Die von den ungarischen Autoren gezogenen Schlußfolgerungen sind daher hinfällig. Es war ja zu erwarten, daß eine Reaktion zwischen den beiden Kolloiden nur äußerst langsam erfolgen könne. Bemerkenswerterweise ist aber auch die Oxydoreduktion mit dem freien Dihydro-Flavin sehr träge; sie ist, bezogen auf gleiche Wirksamkeiten im Leuko-Methylenviolett-Versuch, 30—40-mal langsamer als bei der Fumarat-Hydrase.

II. Fumarat-Hydrase und Succino-Dehydrase.

Die in diesem Abschnitt geschilderten Versuche bezweckten eine Klärung der Funktion und der möglichen Beziehungen beider fumarathydrierenden Fermente. Die Unterschiede zwischen ihren Wirkungen sind in früheren Versuchen aufgezeigt worden[1]); sie sind, kurz zusammengefaßt, die folgenden:

1. Succino-Dehydrase katalysiert die Einstellung eines echten, reversiblen Gleichgewichts zwischen Succinat und Fumarat. Sie dehydriert daher Leuko-Farbstoffe mit Redoxpotentialen bis zu der vom Potential des Säurepaars gesetzten Grenze (— 0,01 V). Fumarat-Hydrase vermag hingegen Wasserstoff nur von Leuko-Farbstoffen mit einem negativeren Normal-Potential als — 0,1 V zu übernehmen; darin äußert sich das negative Potential ihrer gelben Gruppe. Dementsprechend ist ihre Wirkung nicht reversibel und sie dehydriert Succinat nicht.

2. Die Wirkung der Succino-Dehydrase wird durch verschiedene Gifte (Malonat, Oxalat, Fluorid usw.) stark gehemmt, die auf Fumarat-Hydrase nicht oder nur sehr wenig wirken.

[1]) Vgl. Anm. 3, S. 203.

3. Succino-Dehydrase gehört zu den unlöslichen, fixierten Fermenten; ihre Abtrennung von Zelltrümmern ist bis heute nicht gelungen. Fumarat-Hydrase ist demgegenüber ein lösliches Enzym, das einer weitgehenden Reinigung zugänglich ist.

Auch bezüglich des Vorkommens beider Fermente bestehen Unterschiede, die nachzuprüfen waren: Succino-Dehydrase ist in allen untersuchten tierischen Geweben, sowie in Bakterien und einigen niederen Pilzen nachgewiesen. Ihr Vorkommen in der Hefe ist dagegen noch umstritten; auch in höheren Pflanzen scheint das Ferment zu fehlen. Fumarat-Hydrase ist bisher nur aus Hefe isoliert worden.

Vergleich der Geschwindigkeit beider Ferment-Wirkungen.

In Anwesenheit von Fumarat ist Succino-Dehydrase ebenso wie Fumarat-Hydrase zur Dehydrierung von Leuko-Methylenviolett fähig:

a) Leuko-Methylenviolett + Fumarsäure $\xrightarrow[\text{oder}\longrightarrow]{\text{Succino-Dehydrase}}$ Methylenviolett + Bernsteinsäure

Im Testversuch mit diesem Farbstoff kann daher seine Wiederfärbung nur dann der Fumarat-Hydrase zugesprochen werden, wenn das gleiche Fermentpräparat im Methylenblau-Versuch mit Bernsteinsäure als Substrat unwirksam ist.

b) Bernsteinsäure + Methylenblau $\xrightarrow[\text{Dehydrase}]{\text{Succino-}}$ Fumarsäure + Leuko-Methylenblau.

Zum Nachweis eines eventuellen Vorkommens der zwei Fermente nebeneinander und zur Verfolgung beider Fermentwirkungen im Gang der Isolierungsverfahren war es daher erforderlich, zunächst die Geschwindigkeit der Succino-Dehydrase-Wirkung in beiden Testen zu vergleichen.

Bestimmung der Succino-Dehydrase-Wirksamkeit: Die Versuche mit Leuko-Methylenviolett (Fumarat-Versuch) wurden genau wie bei der Fumarat-Hydrase in der S. 205 schon beschriebenen Weise ausgeführt. Die Entfärbung von Methylenblau (Succinat-Versuch) wurde ebenfalls in Thunberg-Röhren beobachtet. Das p_H-Optimum dieser Entfärbung ist von K. Laki[1]) zu 8,75 bestimmt worden. Tatsächlich verläuft die Hydrierung bei diesem p_H 3-mal rascher als bei p_H 7. In die einzelnen Ansätze wird daher neben 0,2 ccm $^m/_{10}$-Natriumsuccinat, 0,1—0,4 ccm

[1]) H. **254**, 25 (1938).

Fermentlösung und 0,25 ccm $^{m}/_{1000}$-Methylenblau, stets noch so viel $^{m}/_{5}$-Boratpuffer vom p_H 8,74 gegeben, daß das Gesamtvolumen 2 ccm beträgt.

Succinodehydrase-Präparate aus frischem Taubenbrustmuskel übertragen in beiden Systemen a) und b) den Wasserstoff mit fast genau gleicher Geschwindigkeit. Führt man (aus Gründen der methodischen Zweckmäßigkeit) den Succinat-Versuch wie üblich bis zur völligen Entfärbung des Methylenblaus, den Fumarat-Versuch aber, wie früher angegeben, nur bis zur 50-proc. Reoxydation des Leuko-Farbstoffs, dann erfolgt die Wasserstoff-Verschiebung im Succinat-Test 4-mal langsamer als im Fumarat-Test. Da stets, unter genauer Einhaltung der angegebenen Versuchsbedingungen, so verfahren wurde, muß zum Vergleich der Succinat-Wert mit 4 multipliziert werden. Derart ist dann das *Wirksamkeitsverhältnis der verschiedenen Präparate im Fumarat- und Succinat-Versuch* angegeben (abgekürzt F : S). Für die Muskel-Succinodehydrase ist F : S = 1 : 1.

A. Versuche mit Hefe und Präparaten aus Hefe.

Über den Nachweis einer Succino-Dehydrase in Hefe liegen in der Literatur widersprechende Beobachtungen vor. Einige Autoren halten ihr Vorkommen zumindest für zweifelhaft[1]). Tatsächlich läßt sich durch Zugabe von Succinat zu frischer, ausgewaschener Hefe weder die Atmung wesentlich erhöhen, noch die Reduktion von Methylenblau beschleunigen[2]) (vgl. Tabelle 11). Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, wie gering die Substrat-Konzentration ist, die zur optimalen Wirkung dieses Ferments reicht, und wenn man die wahrscheinlich sehr schlechte Permeabilität lebender Hefe für Bernsteinsäure berücksichtigt. Zugesetzte Fumarsäure z. B. wird von lebender, gärender Hefe nicht angegriffen[2, 3]), während Trockenhefe, Acetonhefe und gärende Macerationssäfte eine sehr schnelle Hydrierung zu Bernsteinsäure bewirken[2]).

Tatsächlich läßt sich in phosphatfreien Hefeaufschlämmungen eine Verkürzung der Entfärbungszeit von Methylenblau durch Succinat beobachten[4]), ebenso mit Hefezellen, die

[1]) F. Ogston u. D. Green, Bio. J. 29, 1983 (1935).
[2]) W. Robertson, Diss. Freiburg i. Br. 1937.
[3]) H. Wieland, M. Crawford u. H. Walch, A. 525, 119 (1936).
[4]) T. Thunberg, Ar. exp. Zellforsch. 19, 238 (1937).

vorher durch Einfrieren aufgeschlossen worden waren[1]). Bei eingefrorener Hefe erhöhen Succinat-Zusätze auch die Atmung.

1. Versuche mit lebender und plasmolysierter Hefe.

Die lebenden Zellen bzw. die durch Plasmolyse erhaltenen Zelltrümmer wurden 3-mal auf der Zentrifuge mit eiskaltem Wasser gewaschen und in Wasser aufgeschlämmt, derart, daß 1 ccm der Suspension 0,5 g frischer Hefe entsprach. Die Plasmolyse wurde durchgeführt durch Einfrieren in flüssiger Luft oder durch kurze Behandlung mit Essigester. Ihre Herbeiführung mittels Kochsalz oder Rohrzucker lieferte eigentümlicherweise nur unwirksame Präparate.

Tabelle 11.

Hefepräparate ccm		Pufferlösung ccm	Substrat ccm	Farbstoff ccm	Zeit
Lebende Hefe	0,2	0,8 PP	0,1 Fm	1,0 MV	1′ 30″
	0,2	0,9 PP	—	1,0 MV	3′ 30″
	0,2	1,45 BP	0,2 Sc	0,25 MB	12′
	0,2	1,65 BP	—	0,25 MB	11′
	0,2	1,45 BP	0,2 Sc	0,25 DPI	7′ 30″
	0,2	1,65 BP	—	0,25 DPI	3′ 45″
Durch Einfrieren plasmolysiert	0,1	0,8 PP	0,1 Fm	1,0 MV	30″
	0,1	0,9 PP	—	1,0 MV	13 Std.
	0,1	1,45 BP	0,2 Sc	0,25 MB	15′
	0,1	1,55 BP	—	0,25 MB	60′
Mit Essigester plasmolysiert	0,1	0,8 PP	0,1 Fm	1,0 MV	4′
	0,1	0,9 PP	—	1,0 MV	> 12 Std.
	0,1	1,40 BP	0,2 Sc	0,25 MB	> 10 ,,
	0,1	1,60 BP	—	0,25 MB	> 10 ,,

Abkürzungen: Phosphatpuffer $^m/_5$ p_H 7: PP; Boratpuffer $^m/_5$ p_H 8,75: BP; $^m/_{10}$-Kaliumfumarat: Fm; $^m/_{10}$-Natriumsuccinat: Sc; Methylenviolett $^m/_{5000}$: MV; Methylenblau $^m/_{1000}$: MB; Dichlor-phenol-indophenol $^m/_{1000}$: DPI.

Bei eingefrorener und ausgewaschener Hefe wird also, durch die Abwesenheit löslicher Nährstoffe, die Wirkung sowohl Succinat wie Fumarat gegenüber deutlich. Vergleicht man, wie bei der Succino-Dehydrase aus tierischem Gewebe, die Wirksamkeiten in beiden Testversuchen, so ergibt sich das Verhältnis F : S = 2,4 : 1 (bei Tauben-Brustmuskel 1 : 1).

[1]) F. Lynen u. N. Neciullah, A. **541**, 203 (1939).

Die Aktivität der mit Essigester plasmolysierten Hefe ist im Vergleich dazu etwa 10-mal kleiner gegen Fumarat und gegen Succinat so gering, daß sie nicht mehr genau bestimmt werden kann.

In beiden Präparaten plasmolysierter Hefe ist die ganze Fermentwirksamkeit in den Zelltrümmern; die Zellsäfte sind vollkommen inaktiv.

Zur Prüfung der *Zusammenhänge zwischen dem F : S-Verhältnis und der Vorbehandlung* wurden drei verschieden hergestellte Trockenhefen und deren Macerationssäfte untersucht.

2. Versuche mit Trockenhefe.

In der Kälte getrocknete Hefe ist nach der von M. Behrens[1]) für tierische Organe gegebenen Vorschrift leicht herzustellen:

10 g gewaschene, abgepreßte Hefe werden mit flüssiger Luft eingefroren, in einen mit Phosphorpentoxyd beschickten Exsiccator gebracht und rasch mit einer Hochvacuum-Pumpe evakuiert. Nach 24-stündigem Stehen im Eisschrank ist die Hefe ohne aufzutauen getrocknet (kalt getrocknete Hefe). Warm getrocknete Hefe wurde in gewöhnlicher Weise mit Hilfe eines Luftstromes von 30° hergestellt. 1 g der Trockenhefe wurde 3-mal mit je 20 ccm eiskaltem Wasser auf der Zentrifuge gewaschen und auf 8 ccm geschlämmt. Da 0,5 g frischer Hefe 0,125 g Trockenhefe entsprechen, sind die Werte der folgenden Tabelle mit denen von Tab. 11 annähernd vergleichbar. In jedes Thunberg-Rohr kam 0,1 ccm Hefeaufschlämmung.

Tabelle 12.

Hefepräparate	Pufferlösung	Substrat	Farbstoff	Zeit	Mole übertragenen Wasserstoffs	F : S
Kalt getrocknete Hefe	0,8 PP	0,1 Fm	1,0 MV	30″	$15{,}5 \cdot 10^{-8}$	10 : 1
	0,9 PP	—	1,0 MV	3 Std.	—	
	1,45 BP	0,2 Sc	0,25 MB	62′	$0{,}4 \cdot 10^{-8}$	
	1,55 BP	—	0,25 MB	6 Std.	—	
Warm getrocknete Hefe	0,8 PP	0,1 Fm	1,0 MV	9′	$0{,}89 \cdot 10^{-8}$	mindestens 10 : 1
	0,9 PP	—	1,0 MV	3 Std.	—	
	1,45 BP	0,2 Sc	0,25 MB	12 Std.	—	
	1,55 BP	—	0,25 MB	12 Std.	—	
Aceton-Dauerhefe	0,8 PP	0,1 Fm	1,0 MV	1′ 45″	$4{,}6 \cdot 10^{-8}$	23 : 1
	0,9 PP	—	1,0 MV	6 Std.	—	
	1,45 BP	0,2 Sc	0,25 MB	8 Std.	$0{,}05 \cdot 10^{-8}$	
	1,55 BP	—	0,25 MB	24 Std.	—	

[1]) H. 209, 59 (1932).

Es zeigt sich, daß beim Trocknen der Hefe aus dem gefrorenen Zustand *die gesamte Aktivität im Fumarat-Versuch erhalten bleibt, während die Succinat-Wirksamkeit größtenteils verschwindet.* Die gewöhnliche Art des Hefetrocknens hingegen vernichtet fast die gesamte Wirksamkeit in beiden Testversuchen. Was übrig bleibt, sind nur etwa 5 Proc. der Fumarat-Wirkung, die in den durch Einfrieren gesprengten Zellen nachweisbar ist, also keinesfalls mehr als 5 Proc. der Wirkung lebender Zellen. Der zugehörige Succinat-Wert ist zu gering, um noch mit Sicherheit bestimmt zu werden. Die Behandlung mit Aceton und Äther führt ebenfalls zu einer nahezu völligen Aufhebung der Succinat-Wirkung, während die Fumarat-Wirkung zu ungefähr 25 Proc. erhalten bleibt.

Auch bei diesen Präparaten sind die Fermente noch völlig an die Zelltrümmer fixiert. Eine Loslösung findet erst bei der Maceration statt. Vergleicht man die Fumarat-Wirksamkeiten von unter sonst gleichen Bedingungen hergestellten *Macerationssäften* aus warm und kalt getrockneter Hefe, so erweist sich der Saft aus warm getrockneter Hefe, die nur etwa 5 Proc. der Fumarat-Aktivität von kalt getrockneter Hefe besitzt, als etwa 3—4-mal wirksamer. Aus warm getrockneter Hefe können ungefähr 60 Proc. der in ihr noch enthaltenen geringen Fumarat-Aktivität durch Maceration herausgelöst werden, während die kalt getrocknete Hefe nur einen winzigen Bruchteil ihrer hohen Wirksamkeit in löslicher Form abgibt. (Auf die Wiedergabe der Versuchsdaten sei verzichtet.) Offenbar ist also die proteolytische Zersetzung der Hefe, die beim langsamen Trocknen bei Raumtemperatur eintritt[1]), unerläßliche Vorbedingung für das Loslösen der Fumarat-Hydrase.

Der Anteil der Fumarsäure-hydrierenden Wirkung lebender Hefe, der nach geeigneter Vorbehandlung in Lösung gebracht werden kann, ist außerordentlich gering. Wenn z. B. eingefrorene Hefezellen von 0,05 g Frischgewicht im Fumarat-Versuch 28 Sekunden ergeben, der beste Macerationssaft aus 0,08 g Trockenhefe (= 0,32 g frische Hefe) aber 2 Minuten 20 Sekunden, so berechnet sich aus diesen Daten der *in löslicher*

[1]) R. Nilsson u. F. Alm, H. 239, 179 (1936).

Form erhaltene Anteil der Wirksamkeit mit 3 Proc. eher zu hoch als zu niedrig.

3. Gereinigte Fermentlösungen.

Noch deutlicher werden die Verschiebungen zwischen Fumarat- und Succinat-Wirkung bei der Prüfung der gereinigten Fermentlösungen. Verwendet wurden die S. 207 bzw. 209 und 222 in ihrer Herstellung beschriebenen Präparate.

Tabelle 13

Fermentpräparate	ccm	Pufferlösung	Substrat	Farbstoff	Zeit	Mole übertragenen Wasserstoffs	F : S
Gewöhnl. Rohferment 1 : 10	0,2	0,7 PP	0,1 Fm	1,0 MV	1′ 10″	$6{,}9 \cdot 10^{-8}$	10 : 1
	0,2	0,8 PP	—	1,0 MV	> 36 Std.	—	
	0,4	1,15 BP	0,3 Sc	0,25 MB	1 Std. 15′	$0{,}34 \cdot 10^{-8}$	
	0,4	1,35 BP	—	0,25 MB	5 Std.	—	
Rohferm. aus Essigesterautolysaten	0,2	0,7 PP	0,1 Fm	1,0 MV	1′ 40″	$4{,}8 \cdot 10^{-8}$	27 : 1
	0,2	0,8 PP	—	1,0 MV	> 36 Std.	—	
	0,4	1,15 BP	0,2 Sc	0,25 MB	4 Std. 30′	$0{,}09 \cdot 10^{-8}$	
	0,4	1,25 BP	—	0,25 MB	—	—	
Proteinlösung A	0,2	0,7 PP	0,1 Fm	1,0 MV	2′ 56″	$2{,}7 \cdot 10^{-8}$	32 : 1
	0,2	0,8 PP	—	1,0 MV	> 36 Std.	—	
	0,6	0,95 BP	0,2 Sc	0,25 MB	6 Std. 30′	$0{,}06 \cdot 18^{-8}$	
	0,6	1,15 BP	—	0,25 MB	12 Std.	—	
Proteinlösung A + 5 γ AADN	0,2	0,7 PP	0,1 Fm	1,0 MV	1′	$8{,}0 \cdot 10^{-8}$	>80:1
	0,2	0,8 PP	—	1,0 MV	> 36 Std.	—	
	0,6	0,95 BP	0,2 Sc	0,25 MB	5 Std. 30′	$0{,}076 \cdot 10^{-8}$	
	0,6	1,15 BP	—	0,25 MB	12 Std.	—	

Das „gelbe Rohferment" ist bei genauer Prüfung gegen Succinat noch schwach wirksam, viel weniger schon das Rohferment nach Essigester-Autolyse. Das in Proteinanteil und prostethische Gruppe gespaltene, mit Dinucleotid wieder ergänzte Ferment hat nur noch die starke fumarathydrierende Wirkung, während die gegen Succinat praktisch völlig verschwunden ist.

Zur Deutung der geschilderten Feststellungen über die Verschiebungen des F : S-Verhältnisses sind zwei Möglichkeiten näher zu erwägen:

1. Hefe kann Fumarat durch zwei verschiedene Fermente hydrieren: Durch die Succino-Dehydrase (in umkehrbarer

Reaktion) und durch die Fumarat-Hydrase (in nicht umkehrbarer Reaktion). Beim Trocknen, Macerieren usw. wird die Wirkung der Succino-Dehydrase in steigendem Maße zerstört, die der Fumarat-Hydrase bleibt am ehesten erhalten.

2. In der Hefe ist nur ein Ferment zum Stoffwechsel von Succinat-Fumarat: Eine Succino-Dehydrase (F : S = 1 : 1). Beim Trocknen und Macerieren der Hefe, aber auch schon beim Gefrieren, wird diese Dehydrase in wechselndem Maße so verändert, daß sie nur noch zur nicht umkehrbaren Hydrierung von Fumarat fähig ist. Sie wird zur Fumarat-Hydrase.

Es ist nicht möglich, durch Vergleich der Wirkung eingefrorener Hefe und des löslich gewordenen Ferments in Macerationssäften zwischen den beiden Möglichkeiten zu entscheiden; denn dazu sind die Ausbeuten an diesem zu gering. Die völlige Erhaltung der Wirksamkeit gegen Fumarat und der gleichzeitige starke Verlust der Wirksamkeit gegen Succinat in Hefe, die in eingefrorenem Zustand getrocknet wurde, spricht jedoch für die zweite Deutung.

Vor ihrer näheren Diskussion seien weitere Versuche erwähnt, in denen das Verhalten tierischen Gewebes im Succinat- und Fumarat-Test geprüft wurde.

B. Versuche mit tierischen Geweben.

Verwendung fand die Beinmuskulatur von Fröschen oder die Brustmuskulatur von Tauben; die Tiere wurden unmittelbar vor dem Versuch getötet. Zur Herstellung der *Gewebe-Preßsäfte und Suspensionen* wurden 5 g der feinst zerschnittenen Muskulatur mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, in 10 ccm Wasser aufgenommen und eingefroren. Nach dem Zerstoßen der gefrorenen Masse im Mörser wurde der Brei kurz zentrifugiert. Die überstehende Lösung war leicht getrübt und meist schwach rosa gefärbt (Gewebe-Preßsaft). Der Rückstand wurde in 10 ccm Wasser suspendiert (Gewebe-Suspension).

Zur *Trocknung* der Muskeln wurde verfahren, wie bei der Hefe angegeben ist und entweder die gefrorene Muskelmasse bei 0° getrocknet (kalt getrockneter Muskel) oder in dünnster Schicht mit Luft bei 35° innerhalb 2—3 Stunden (warm getrockneter Muskel). Zur Herstellung der Macerationssäfte wird der Trockenmuskel nach dem Auswaschen mit Wasser in $^n/_5$-sek. Natriumphosphat-Lösung 3 Stunden bei 35° maceriert.

Sämtliche Präparate mit Ausnahme des Trockenmuskels werden eingefroren bei − 80° aufbewahrt. Nur so sind sie wochenlang unverändert haltbar; bei 0° verschwindet die Aktivität in kurzer Zeit vollständig.

Tabelle 14

Je Thunberg-Rohr 0,1 ccm der Preßsäfte bzw. 0,2 ccm Suspension

Präparat	Gemessene Zeiten und Mole übertragenen Wasserstoffs		Verhältnis F : S
	Fumarat-Vers.	Succinat-Vers.	
Preßsaft aus Froschmuskel 1	3′ $2{,}7 \cdot 10^{-8}$ Mole	30′ $0{,}83 \cdot 10^{-8}$ Mole	1 : 1,3
Preßsaft aus Froschmuskel 2	2′ 10″ $3{,}7 \cdot 10^{-8}$ Mole	35′ $0{,}71 \cdot 10^{-8}$ Mole	1,3 : 1
Preßsaft aus Taubenmuskel	3′ 30″ $2{,}4 \cdot 10^{-8}$ Mole	41′ $0{,}61 \cdot 10^{-8}$ Mole	1 : 1
Gewebesuspension (Froschmuskel)	8′ $1{,}0 \cdot 10^{-8}$ Mole	60′ $0{,}41 \cdot 10^{-8}$ Mole	1,6 : 1
Gewebesuspension (Taubenmuskel)	20″ $24 \cdot 10^{-8}$ Mole	4′ 20″ $6{,}10 \cdot 10^{-8}$ Mole	1 : 1
Suspension aus kalt getrocknet. Muskel (frisch)	55″ $7{,}5 \cdot 10^{-8}$ Mole	15′ 30″ $1{,}6 \cdot 10^{-8}$ Mole	1,2 : 1
Mac.-Saft aus kalt getrocknetem Muskel	10′ 30″ $0{,}76 \cdot 10^{-8}$ Mole	8 Std. $0{,}05 \cdot 10^{-8}$ Mole	3,8 : 1

Ohne Fumarat- bzw. Succinat-Zusatz ist keine Reaktion wahrnehmbar.

Man erkennt, daß die untersuchten Fermentwirkungen des Muskelgewebes sich anders verhalten als bei der Hefe. Das F : S-Verhältnis bleibt auch bei verschiedener Vorbehandlung annähernd 1 : 1.

Etwas abweichende Verhältnisse zugunsten der Fumarat-Hydrierung findet man in den Macerationssäften [nähere Angaben[1])]; doch ist ihre Aktivität so gering, und ihre Unbeständigkeit so groß, daß sich kein sicherer Schluß daraus ziehen läßt. Die außerordentliche Unbeständigkeit der Ferment*lösungen*, die selbst bei 0° in 3—4 Stunden die Hälfte ihrer Wirksamkeit verlieren können, erschwert ihre nähere Untersuchung. Zugaben von Alloxazin-Adenin-Dinucleotid bewirkten keine Reaktivierung.

Auch die Untersuchung der Extrakte verschiedener *pflanzlicher Materialien* ergab ein F : S-Verhältnis = 1. Bei

[1]) Vgl. Anm. 2, S. 203.

seinen Arbeiten über die Pflanzen-Dehydrasen hat T. Thunberg[1]) zwar eine Donator-Wirkung der Bernsteinsäure so gut wie immer vermißt; lediglich verschiedene Bohnenarten schienen ihm Succino-Dehydrase in geringen Konzentrationen zu enthalten[2]). Mit Hilfe der empfindlicheren Reaktion mit Leuko-Methylenviolett ist jedoch ein sicherer Nachweis einer Fumarat-Hydrierung nicht nur in Bohnen, sondern auch in anderen Materialien pflanzlicher Herkunft und in höheren Pilzen möglich[3]).

IV. Zusammenfassende Bemerkungen.

Die Schwierigkeiten der Reindarstellung gelber Fermente spiegeln sich in den Versuchen des 1. Teils dieser Arbeit. Wesentlich bedingt sind sie bei der Fumarat-Hydrase durch die Dissoziation von Protein und prosthetischer Gruppe, die wiederholte Fällungen mit organischen Lösungsmitteln oder mit Ammoniumsulfat, besonders in schwach saurer Lösung, wiederholte Adsorptionen und langdauernde Dialysen verbietet. Es ist möglich, daß Verfahren zur Reinigung des Proteinanteils und die Rekombination nach erfolgter Reindarstellung weiterführen können.

Die Ergebnisse mahnen zur Vorsicht in der Beurteilung der Reinheit (im Sinne einer einheitlichen enzymatischen Wirkung und einer Einheitlichkeit des Proteinanteils) auch bei anderen gelben Fermenten. Nach der Erkenntnis der Vielzahl gelber Fermente genügt es nicht, wenn das Verhältnis von gelber Gruppe und Eiweißträger die weitgehende Anreicherung eines Flavoproteids anzeigt.

Die „Reindarstellung" des Flavinenzyms nach der Adsorptionsmethode von Weygand und Stocker[4]) führt z. B., wie gezeigt wurde, nicht zum einheitlichen Lactoflavin-Proteid, sondern zu einem Gemisch von diesem mit dem Dinucleotid-Proteid der Fumarat-Hydrase, vermutlich auch mit anderen Flavo-Proteiden.

---

[1]) Rev. Biol. 5, 318 (1930).
[2]) T. Thunberg, Ar. int. physiol. 18, 601 (1922).
[3]) Vgl. Anm. 2, S. 203.
[4]) Vgl. Anm. 2. S. 212.

Auch nach der elektrophoretischen Methode von Theorell gelingt in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Flavinenzyms (p_H 5,25) keine Trennung von Flavinenzym und Fumarat-Hydrase. Erst im schwach alkalischen Medium (p_H 8,5) werden die Ionenbeweglichkeiten der beiden Fermente so verschieden, daß eine weitgehende Scheidung gelingt. Dabei zeigt sich, daß auch das auf Codehydrasen eingestellte gelbe Ferment uneinheitlich ist und mindestens zwei im Methylenblau-Versuch wirkende Proteide verschiedener Wanderungsgeschwindigkeit enthält. Wahrscheinlich handelt es sich um das „alte" gelbe Ferment von Warburg und Christian[1]) und um das „neue" von E. Haas[2]).

Als prosthetische Gruppe der Fumarat-Hydrase ist ausschließlich das Alloxazin-Adenin-Dinucleotid zu betrachten, wie aus den Versuchen der Rekombination mit dieser gelben Gruppe nach der Abtrennung des Protein-Anteils hervorgeht, die im 2. Teil der Veröffentlichung beschrieben sind. Vielleicht hilft die Beobachtung, daß diese Wiedervereinigung eine langsam verlaufende Reaktion ist, auch für die Synthese anderer gelber Fermente, deren Rekombination bisher nicht erreicht werden konnte.

Dem Lactoflavinphosphat kommt lediglich eine, sich in den Versuchen der Ferment-Auswertung mit Leuko-Farbstoffen äußernde, beschleunigende Wirkung zu, die auch vom nicht phosphorylierten Lactoflavin ausgeübt wird. Allerdings deutet die schnelle Reaktion zwischen dem freien Flavin und der gelben Gruppe des Ferments auf eine mögliche physiologische Bedeutung dieser Oxydoreduktion hin.

Mit einem anderen der bisher bekannten gelben Fermente ist Fumarat-Hydrase nicht identisch. Xanthin-Dehydrase, d-Aminosäuren-Dehydrase und Aldehyd-Dehydrase fehlen schon in dem als Ausgangsprodukt dienenden „gelben Rohferment". Durch Elektrophorese gelang die nahezu völlige Abtrennung der auf Dihydro-Codehydrasen eingestellten Flavinenzyme. Das „alte" gelbe Ferment unterscheidet sich von der Fumarat-Hydrase nicht nur in der prosthetischen

[1]) Vgl. Anm. 2, S. 204. [2]) Vgl. Anm. 2, S. 209.

Gruppe, sondern auch im Protein-Anteil: Vereinigt man nach der Spaltung sein Protein mit Alloxazin-Adenin-Dinucleotid, wie das schon Warburg und Christian[1]) gemacht haben, so erhält man ein Ferment, das keine Fumarathydrase-Wirksamkeit zeigt.

Von der neuerdings gekennzeichneten Cytochrom c-Reduktase[2]), die Lactoflavin als gelbe Gruppe enthält, unterscheidet sich die Fumarat-Hydrase ja schon durch die prosthetische Gruppe; es ist aber bisher nicht geprüft worden, ob Fumarat-Hydrase mit Cytochrom c reagiert oder nicht.

Von Green, Knox und Stumpf[3]) ist in jüngster Zeit die Gewinnung eines Flavo-Proteids aus Hefe-Macerationssaft mit Alloxazin-Adenin-Dinucleotid als gelbe Gruppe beschrieben worden. Von den Autoren wird angegeben, daß die Ferment-Wirkung dieses Proteids noch unbestimmt sei, da es mit keinem der geprüften Substrate reagierte.

Befolgt man die Vorschrift zur Gewinnung dieses Flavoproteids, die im wesentlichen eine Reihe von Ammoniumsulfat-Fällungen mit Adsorptionen an Tonerde kombiniert, so erhält man ein Ferment-Präparat, welches eine Fumarathydrase-Aktivität zeigt, die etwas stärker ist als die des in der vorliegenden Arbeit verwendeten „gelben Rohferments". Auf andere Fermentwirkungen haben wir nicht geprüft.

Da eine Abtrennung der auf Codehydrasen wirkenden Flavinenzyme von der Fumarat-Hydrase gelungen ist, steht es fest, daß sie zur *direkten* Reaktion mit den Codehydrase-bedürftigen Systemen nicht befähigt ist und eines Mittlers bedarf. Durch ihre Wirkung können jedenfalls alle zur Hydrierung ihrer gelben Gruppe tauglichen Oxydoreduktionen zur Hydrierung der Fumarsäure führen und so in den Kreislauf der C_4-Dicarbonsäuren einmünden.

Zur Hydrierung der Äthylenbindung α,β-ungesättigter Alkohole ist Fumarat-Hydrase nicht fähig. Von dem „Äthylen-Hydrase" genannten Ferment ist sie also sicherlich verschieden[4]).

Bestimmte Vorstellungen über ihre Funktion bei den Vorgängen der Gärung werden durch die Versuche der vorliegen-

[1]) Vgl. Anm. 3, S. 204.
[2]) J. biol. Chem. **188**, 776 (1941).
[3]) Vgl. Anm. 3, S. 225.
[4]) Vgl. Anm. 3, S. 203.

den Arbeit nicht nahegelegt; sie würden auch, in Anbetracht der Unkenntnis des Zusammenwirkens gelber Fermente, durchaus verfrüht sein. Wesentlich sind jedoch in dieser Richtung die im 3. Teil dargelegten Versuche zum Vergleich der Wirkung der Fumarat-Hydrase mit jener der Succino-Dehydrase. Sie weisen darauf hin, daß beim Verschwinden des Vermögens der Hefe zur Succinat-Dehydrierung jenes zur Fumarat-Hydrierung erhalten bleiben kann und lassen vermutlich die Fumarat-Hydrase als „verdorbene" Succino-Dehydrase erscheinen. Schwer verständlich wäre dabei die Funktion der nachgewiesenen gelben prosthetischen Gruppe und die Intensivierung des zur Fumarat-Hydrierung zumindest erforderlichen Reduktionspotentials.

Man könnte vermuten, daß die Succino-Dehydrase aus Hefe ebenfalls ein Flavoproteid sei, aber in unverändertem Zustand von höherem Potential. Alle bisherigen Untersuchungen über Succino-Dehydrase betreffen die des tierischen Gewebes, die sich ja in unseren Versuchen anders verhält. Keine deutet auf die Zugehörigkeit dieses Ferments zu den gelben; in einigen ist eine Metall-Proteid-Natur diskutiert worden[1]), in anderen ist die Anwesenheit von Sulfhydryl-Gruppen für die Fermentwirkung als wesentlich angenommen worden[2]). Das verlorengegangene Vermögen zur Succinat-Dehydrierung beim Trocknen und Macerieren der Hefe läßt sich jedenfalls durch Behandlung mit Thiolen nicht wieder erlangen, wie es für die tierische Succino-Dehydrase beschrieben ist[2]).

Mit der Frage nach den Beziehungen der Fumarat-Hydrase zur Succino-Dehydrase ist eine Frage berührt, die für die gesamte Fermentchemie Bedeutung hat: Inwiefern nämlich durch die Isolierung von Fermenten, insbesondere durch das Löslichmachen fixierter Fermente ihr Wirkungsvermögen verändert wird. Es häufen sich die Anzeichen, die auf solche, zum Teil sehr weitgehende Spezifitätsveränderungen deuten.

---

[1]) L. Massart, H. 258, 190 (1939).

[2]) F. G. Hopkins, E. J. Morgan u. C. Lutwak-Mann, Bio. J. 32, 1827 (1938).

Zur Kenntnis der pflanzlichen Aldehyd-Dehydrasen. I*);

von *Wilhelm Franke* und *Fritz Schumann*[1]).

Mit 8 Figuren im Text.

[Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München.]

(Eingelaufen am 4. Juni 1942.)

Bekanntlich existieren *zwei* Enzyme *tierischer* Herkunft, welche Aldehyde zu den entsprechenden Säuren oxydieren: einmal das lange bekannte und überaus eingehend untersuchte Schardinger-Enzym der Milch und Leber, dessen Substratspezifität sich nicht nur auf Aldehyde, sondern auch auf Oxypurine erstreckt; dann die neuerdings von Gordon, Green & Subrahmanyam[2]) in der Leber aufgefundene Aldehyd-dehydrase (oder abgekürzt *Aldehydrase*), der bei im übrigen ähnlichen Eigenschaften diese Doppelspezifität abgeht. Bei beiden Fermenten handelt es sich um *Aero-dehydrasen*[3]) und „*gelbe Fermente*", in deren prosthetische Gruppe Flavinadenin-dinucleotid eingeht[2, 4]).

Im Gegensatz zu der umfangreichen Literatur, die über tierische Aldehydrasen vorliegt, beschränkt sich diejenige über das *pflanzliche* Enzym auf einige wenige Arbeiten, deren letzte zudem mehr als 10 Jahre zurückliegt.

Als erster erhebt A. Bach[5]) (1913) den Befund, daß roher Kartoffelsaft bei Gegenwart von Aldehyd *Nitrat* zu Nitrit zu reduzieren vermag, nicht hingegen *Methylenblau* zum Leukofarbstoff.

Erst 9 Jahre später macht Smorodinzew[6]) einige ergänzende Angaben über die Löslichkeit des Ferments in Wasser und Elektrolyt-

*) Herrn Geheimrat Wieland zum 65. Geburtstag.

[1]) Dissertation, Universität München, 1942.

[2]) Biochem. J. 34, 764 (1940).

[3]) Zur Nomenklatur vgl. z. B. W. Franke, Angew. Chemie 53, 580 (1940).

[4]) E. G. Ball, J. biol. Chem. 128, 51 (1939).

[5]) Bio. Z. 52, 412 (1913). [6]) H. 128, 130 (1922).

lösungen, die Kinetik der Nitratreduktion, den Einfluß des Sauerstoffs, die Abhängigkeit der Enzymausbeute vom Alter des Ausgangsmaterials und dergleichen mehr.

1927 stellt Michlin[1]) Acetonpräparate des Kartoffelenzyms dar, an denen die Befunde Bachs hinsichtlich Acceptorspezifität bestätigt werden und die auf Aldehyde beschränkte Donatorspezifität des pflanzlichen gegenüber dem tierischen Ferment hervorgehoben wird.

Ein Jahr später fällt Bernheim[2]) Kartoffelpreßsaft mit Ammonsulfat und gewinnt aus dem Niederschlag Enzymlösungen, die unter bestimmten Bedingungen in Aldehydgegenwart sowohl Nitrat wie Methylenblau als Acceptoren verwerten konnten. Während für die Nitratreduktion eine breite p_H-Zone zwischen 3 und 8,6 mit dem Optimum bei 6 existierte, fand er mit Methylenblau nur zwischen p_H 5,6 und 7,8, mit einem Optimum bei p_H 7, enzymatische Wirkung. Ferner wurde für eine Reihe der Clarkschen *Redoxindikatoren* von definiertem Potential sowie für *Chinon* Acceptoreigenschaft angegeben. Die Rolle des *Sauerstoffs* mußte ungeklärt bleiben, da er in Gegenwart von Aldehyd schädigend auf das Enzym wirkte.

Im selben Jahre kam Michlin[3]) in der Frage der Verwertung von Nitrat und Methylenblau durch das Enzym im wesentlichen zu den gleichen Befunden wie Bernheim. Er äußert die Vermutung, daß die auffallenden Unterschiede im Verhalten von tierischer und pflanzlicher Aldehydrase (Spezifität, p_H-Abhängigkeit, Wirkung von Alkali und HCN usw.) „im mangelnden Gehalt des pflanzlichen Fermentsystems an irgendeinem *Coenzym* zu suchen ist".

Bei den im einzelnen zum Teil mangelhaften, zum Teil widerspruchsvollen Angaben über die Natur der pflanzlichen Aldehydrase schien eine nochmalige Nachprüfung ihrer Eigenschaften nicht ohne Interesse, um so mehr, als systematische Reinigungsversuche am Ferment offenbar überhaupt noch nicht angestellt worden sind.

Leider stießen wir dabei auf unerwartet große Schwierigkeiten. Einmal zeigte sich schon nach den ersten Versuchen, daß die Ergebnisse der älteren Autoren, auf denen weitergebaut werden sollte, großenteils nicht reproduzierbar waren. Schlimmer noch waren die durch Kartoffelsorte, Aufbewahrungsdauer, Jahreszeit und dergleichen bedingten sehr bedeutenden Aktivitätsschwankungen des Ausgangsmaterials, das in der Kriegszeit häufig nicht in der erforderlichen Menge

[1]) Bio. Z. **185**, 216 (1927).
[2]) Biochem. J. **22**, 344 (1928).
[3]) Bio. Z. **202**, 329 (1928).

und Beschaffenheit erhältlich war. Andere Pflanzenspezies kamen infolge Enzymarmut bzw. -mangels als Ausgangsmaterial überhaupt nicht in Frage.

Aus diesen und anderen Gründen ist die beabsichtigte weitgehende Reinigung des Enzyms nur teilweise geglückt. Immerhin gelang eine Anreicherung auf das über *100-fache* des Enzymgehaltes der Kartoffel. Als wesentliche Feststellung muß der Nachweis der *Globulin*natur des Ferments betrachtet werden. Außerdem wurden weitere Eigenschaften der Aldehydrase durch zahlreiche Versuche über die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Ferment-, Substrat- und Wasserstoffionen-konzentration, von der Art der Pufferung, von der Temperatur usw. weitgehend klargestellt und die zum großen Teil falschen Angaben der früheren Autoren widerlegt.

Die Frage der Verwertbarkeit von *Sauerstoff* als Wasserstoffacceptor konnten auch wir infolge der schon früher beobachteten Enzymschädigung nicht einwandfrei beantworten; der augenblickliche Stand der Lage spricht allerdings für eine Einreihung der pflanzlichen Aldehydrase in die Gruppe der *Anaero-dehydrasen.*

Die starke Vorliebe des Enzyms für den sonst bei Dehydrasen nicht alltäglichen Acceptor *Nitrat* ist auffallend. Ganz abgesehen vom Unterschied des p_H-Optimums für Nitrat- und Farbstoffreduktion läßt die mehrfach gemachte Feststellung, daß gewisse Enzymlösungen zur Methylenblaureduktion nicht befähigt waren, während die Fähigkeit zur Nitratreduktion sehr stark ausgebildet war, auf die Existenz eines zur *Farbstoff*hydrierung notwendigen „Zusatzfaktors" schließen.

Versuche.

I. Aktivitätsbestimmung.

1. Nitratreduktion.

Wie Bernheim und Michlin bedienten auch wir uns zur Messung von Enzymaktivitäten im allgemeinen der schon von Bach verwendeten *colorimetrischen* Methode, bei der das

durch Reduktion entstandene Nitrit nach P. Griess als intensiv gelbroter Azofarbstoff zur Bestimmung gelangt[1]).

In einem Thunberg-Röhrchen wurde 1 ccm der zu untersuchenden (eventuell entsprechend verdünnten) Enzymlösung mit

2 ccm $^m/_5$-Phosphat-Citronensäurepuffer (p_H 5,5),
1 ccm $^m/_2$-$NaNO_3$ sowie
1 ccm $^m/_{10}$-Croton- bzw. Acetaldehyd

versetzt, bis zum Sieden der Reaktionsflüssigkeit evakuiert und das Vakuumröhrchen anschließend in einen Thermostaten von 30,0° gebracht. Nach 2 Stunden wird Reagenzlösung nach Lunge-Ilosvay (5 ccm) zugesetzt, der dabei entstehende Eiweißniederschlag nach 15 Minuten langem Stehen abzentrifugiert und das in der Lösung enthaltene Nitrit durch Einordnung des Röhrchens in eine um je 0,02 mg Nitrit ansteigende Vergleichsskala bestimmt.

Um vergleichbare Farbtöne zu erhalten, war es unbedingt erforderlich, auch die Farbstofflösung in der Vergleichsskala mit je 1 ccm der als Substrat verwendeten Aldehydlösung zu versetzen. Dagegen konnte und mußte auf die von Bach angewandte Enteiweißung mittels Bleiacetat verzichtet werden, da die durch den Puffergehalt der Enzymlösung bedingten Bleiphosphatniederschläge unbestimmte Nitritmengen adsorbierten.

In einigen Fällen wurde die colorimetrische Nitritbestimmung durch die neuerdings von Brooks und Pace[2]) angegebene *manometrische* Methode auf ihre Zuverlässigkeit geprüft. Das Prinzip dieser Methode liegt in der Zersetzung der salpetrigen Säure durch überschüssige Amidosulfonsäure nach der Gleichung

$$HNO_2 + NH_2SO_3H = H_2SO_4 + H_2O + N_2$$

und Messung des entbundenen Stickstoffs in der van Slyke- oder Warburg-Apparatur. Die Genauigkeit wird bei ~0,1 mg $NaNO_2$ zu ± 10 Proc. angegeben.

Bei Ermittlung des Einflusses der Enzymkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit lieferten beide Methoden im wesentlichen dieselben Werte (vgl. Fig. 1, S. 252). Deshalb wurde im Verlauf der Untersuchungen der bequemer durchführbaren colorimetrischen Nitritbestimmung zumeist der Vorzug gegeben.

---

[1]) Vgl. z. B. F. P. Treadwell, Lehrb. d. anal. Chem. II, S. 295 (Leipzig und Wien 1922).

[2]) Biochem. J. 34, 260 (1940).

Als Maß enzymatischer *Aktivitäten* dient im folgenden der der bekannten „Atmungsgröße" nachgebildete Quotient

$$A = \frac{\text{cmm } O_2 \text{ (Reduktionsäquivalent)}}{\text{mg Trockengewicht} \cdot \text{Stunden}},$$

als Maß von *Enzymmengen* das Produkt

$$E = A \cdot \text{mg Trockengewicht}.$$

Die Quotienten A/A_0 und E/E_0 stellen den auf das Ausgangsmaterial bezogenen *Anreicherungsgrad* bzw. die *Enzymausbeute* dar.

2. Methylenblaureduktion.

Die Durchführung dieser Versuche erfolgte nach der bekannten Thunberg-Methodik[1]), gleichfalls bei 30°.

Im allgemeinen bestand der Ansatz aus

1 ccm Enzymlösung,
2 ccm $^m/_5$-Puffer (meist p_H 8,7),
1 ccm Methylenblau 1 : 10 000 (etwa $^m/_{4000}$),
1 ccm $^m/_{10}$-Acetaldehyd.

Wo es sich um den leichteren Vergleich von Nitrat- und Methylenblauversuchen handelte, wurden die Entfärbungszeiten t der letzteren in relative Reaktionsgeschwindigkeiten

$$1 = 1000\left(\frac{1}{t} - \frac{1}{t_0}\right)$$

umgerechnet (t_0 = Entfärbungszeit des substratfreien Kontrollansatzes, die meist vernachlässigt werden konnte).

Da infolge der zumeist starken Eigenfärbung der Enzymlösungen der Zeitpunkt vollständiger Entfärbung schwer zu bestimmen war, wurden unter t bzw. t_0 die zu 80-proc. Farbstoffreduktion notwendigen Zeiten verstanden.

II. Ausgangsmaterial.

Wie schon Wieland u. Sutter[2]) früher gezeigt haben, ist es für die Aktivität der extrahierbaren Aldehydrase — im

[1]) Vgl. neueste Zusammenfassung von C. G. Holmberg bei Bamann-Myrbäck, D. Methoden d. Fermentforsch. III, S. 2278 (Leipzig 1941).

[2]) B. 63, 66 (1930).

Gegensatz zur Polyphenoloxydase — belanglos, ob man von den *Schalen-* oder *Kern*teilen der Kartoffelknolle ausgeht.

Dagegen sind Kartoffel*sorte* und *Jahreszeit* von ausschlaggebender Bedeutung. Der Aktivitätswert *A* von Kartoffelrohsäften variierte innerhalb eines Jahres zwischen 0,3 und 1,6. Im allgemeinen läßt sich auf Grund unseres sehr umfangreichen Versuchsmaterials sagen, daß früh geerntete Sorten (Mai—Juli) enzymarm, spät geerntete (September—November) enzymreich sind; doch ist diese Regel nicht ohne Ausnahme, da sich auch unter typischen „Winterkartoffeln" enzymarme Sorten finden. Bei längerer Lagerung nimmt auch der Enzymgehalt sehr enzymreicher Sorten ab, am stärksten offenbar im Spätwinter und Frühjahr.

Außer in der Kartoffel, einer typischen Sproßknolle, wurde auf das Vorhandensein einer nitratreduzierenden Aldehydrase noch in folgenden anderen Pflanzen — meist ebenfalls Wurzel- und Sproßknollen — geprüft:

Zuckerrübe	Sellerie
Runkelrübe	Rettich
Gelbe Rübe	Dahlie
Kohlrabi	Herbstzeitlose

Löwenzahn (getrennt nach Wurzeln und Blättern)
Aspergillus oryzae
Bierhefe (getrocknet)

Von einer geringfügigen Nitratreduktion im Falle des *Schimmelpilzes* abgesehen, erwiesen sich die Phosphatextrakte sämtlicher untersuchten Pflanzenmaterialien als enzymatisch unwirksam.

III. Reinigung.

Schon die ersten orientierenden Versuche zeigten, daß es für die Enzymisolierung vorteilhafter ist, mit *Salzlösungen* statt, wie bisher meist geübt, mit Wasser zu extrahieren oder sich gar mit der Herstellung eines Preßsaftes zu begnügen. Tab. 1 orientiert über das Ergebnis einiger Extraktionsversuche[1]).

Es wurden jeweils 100 g durch die Fleischhackmaschine getriebener Kartoffelbrei 1 Stunde lang in der Kugelmühle mit 100 ccm der Extrak-

[1]) Vgl. auch F. Kubowitz, Bio. Z. 292, 221 (1937).

tionsflüssigkeit geschüttelt, die Masse durch ein Koliertuch gepreßt, zentrifugiert und die Aktivität der erhaltenen Enzymlösungen nach der Nitratmethode (2 Stunden Reaktionszeit bei p_H 5,8 und 30°) bestimmt. Die Zahlen der letzten Spalte von Tab. 1 geben den Enzymgehalt der Lösungen in relativen Einheiten an, wobei derjenige der $^m/_{10}$-Na_2HPO_4-Lösung willkürlich gleich 100 gesetzt worden ist.

Tabelle 1.

Extraktionsflüssigkeit	Konzentration	p_H d. Extraktionsflüssigkeit	p_H d. Enzymlösung	Relativer Enzymgehalt
Na_2HPO_4	$^m/_{50}$	8,0	6,9	60
„	$^m/_{10}$	8,15	7,0	100
„	$^m/_5$	8,15	7,25	120
„	$^m/_2$	8,2	7,55	60
Na_2HPO_4–KH_2PO_4	$^m/_{10}$	6,75	6,5	50
Na-Acetat	$^m/_{10}$	7,0	6,2	50
KNO_3	$^m/_2$	6,05	6,05	50
NaCl	$^m/_5$	6,8	6,3	0
Na_3-Citrat	$^m/_5$	7,25	6,7	0
NH_4Cl	$^m/_5$	6,85	6,2	0
NH_4Cl–NH_3	$^m/_{10}$	9,4	7,5	100
Wasser	—	etwa 7	5,9	10

Der Enzymgehalt der Lösungen und — da das Trockengewicht mit diesem im wesentlichen parallel geht — die *Löslichkeit* des Enzyms hängt ersichtlich von drei Faktoren ab: 1. dem p_H, 2. der Salzkonzentration und 3. der Art der Ionen. Die Enzymlöslichkeit steigt mit dem p_H und — bis zu einer gewissen Grenze — mit der Salzkonzentration; Phosphat erweist sich als zur Extraktion besonders geeignet. Die Löslichkeitseigenschaften des Enzyms sprechen für ein *Globulin*.

Alle weiteren Extraktionsversuche wurden mit $^m/_{10}$-Na_2HPO_4-Lösung durchgeführt, da das pflanzliche Material ja selbst noch Salze enthält und zu hohe Salzkonzentrationen offenbar Aussalzeffekte mit sich führen können.

Folgender Reinigungsgang erwies sich als vorteilhaft:

1. Phosphatextraktion. Kartoffelbrei — dessen spezifische Wirksamkeit bei guten Kartoffeln

$$A = 0{,}04$$

beträgt — wird, wie oben näher beschrieben, mit $^{m}/_{10}$-Na_2HPO_4 (1 ccm/g) extrahiert. Der klarzentrifugierte, dunkelbraune Rohsaft vom p_H 7—7,5 zeigt die Aktivität

$$A = 0{,}8—1{,}4$$

bei einer Enzymausbeute von 40 Proc.

Versuche, durch noch weitergehende Aufteilung des Zellgefüges (z. B. Zerreiben mit Quarzsand, Frieren in flüssiger Luft und Wiederauftauen, Autolyse) zu höheren Enzymausbeuten zu gelangen, waren erfolglos.

2. Dialyse. Der Rohextrakt wird zweckmäßigerweise der Dialyse gegen Wasser unterworfen, wodurch niedermolekulare Stoffe entfernt werden, die beim Verbleib in der Lösung das Enzym progressiv inaktivieren würden. Aus der praktisch elektrolytfrei gewordenen dialysierten Lösung fällt das Ferment als Globulin quantitativ aus.

Die Dialyse wurde einmal gegen fließendes Leitungswasser von 12° durchgeführt, wobei sich der Extrakt in ruhenden Cellophanschläuchen befand, das andere Mal gegen fließendes destilliertes Wasser von 4°, wobei der Schlauch in fortwährender Schaukelbewegung erhalten wurde. Nach beendigter Dialyse wurde das ausgefallene Enzym mit $^{m}/_{10}$-Na_2HPO_4-Lösung wieder in Lösung gebracht und Aktivität und Ausbeute bestimmt (Tab. 2).

Tabelle 2.

Außenflüssigkeit	Dialysendauer	A		Ausbeute in Proc.
		vor Dialyse	nach Dialyse	
Leitungswasser (12°) .	3 Tage	1,08	2,3	58
dest. Wasser (4°) . .	2 Tage	1,08	2,6	90

Eine gleichfalls versuchte Dialyse (bei 4°) gegen Phosphat von der Konzentration der Innenflüssigkeit, bei der das Enzym in Lösung blieb, brachte keine Anreicherung mit sich und wurde daher wieder aufgegeben.

Nach den Erfahrungen der Vorversuche wurde zur präparativen Enzymdarstellung stets bei 4° im Schüttelthermostaten 2 Tage lang gegen fließendes destilliertes Wasser dialysiert und der dabei ausgefallene Globulinniederschlag in einem Viertel des ursprünglichen Phosphatvolumens wieder aufgenommen.

3. Ammonsulfatfällung. Eine in der beschriebenen Weise vorgereinigte Fermentlösung von der Wirksamkeit $A = 2{,}6$ wurde mit festem Ammonsulfat bis zu 30-proc. Sättigung versetzt, die abzentrifugierte und in wenig Wasser aufgenommene Fällung einen Tag lang gegen fließendes destilliertes Wasser dialysiert und der Enzymniederschlag wiederum in $^{m}/_{10}$-Na_2HPO_4 gelöst. Für die resultierende Enzymlösung war

$$A = 5{,}1$$

bei einer Ausbeute des letzten Schrittes von 45 Proc.; der gesamte Anreicherungsgrad A/A_0 war demnach 125-fach, die Gesamtausbaute E/E_0 16 Proc. Wesentlich aktivere Enzymlösungen oder bessere Enzymausbeuten wurden bisher nicht erzielt. Die erhaltenen Lösungen sind vollkommen klar, zeigen aber noch die tiefbraune Färbung der Kartoffelrohsäfte.

Die Aldehydrase fällt im wesentlichen bei einem Sättigungsgrad zwischen 10 und 30 Proc. Ammonsulfat aus; eine Fraktionierung in diesem Gebiet war — offenbar infolge der bei verlängerter Berührung mit Ammonsulfat eintretenden Fermentschädigung — ohne Erfolg.

4. Weitere Versuche und Kritik der älteren Methoden. Orientierende Versuche zu weiterer *adsorptiver Reinigung* des Ferments haben einstweilen noch kein befriedigendes Ergebnis gezeitigt.

Es gelingt zwar, das Enzym bei p_H 6 an *Kaolin* zu adsorbieren und mit $^{m}/_{10}$-Na_2HPO_4 bei p_H 8,2 wieder zu eluieren. Doch stieg dabei die Aktivität nur geringfügig an (z. B. von 4,0 auf 5,0) bei einem Fermentverlust von rund 50 Proc.

Unbrauchbar erwies sich zu Reinigungszwecken die von Michlin (a. a. O., S. 244) angegebene *Acetonfällung*.

Selbst bei raschestem Verarbeiten kleiner Volumina bei tiefer Temperatur (z. B. innerhalb 10 Minuten bei $-20°$) war das mit dem 3-fachen Volumen Aceton gefällte Enzym nur mehr halb so aktiv als der ursprüngliche Rohextrakt.

Ebenso unvorteilhaft ist die von Bernheim (a. a. O., S. 244) angewandte *direkte Ammonsulfatfällung von Preßsäften*, bei der gleichfalls keine Anreicherung, sondern weitgehende Inaktivierung des Ferments erfolgt.

Entgegen den Behauptungen sowohl von Michlin wie von Bernheim wurde ferner immer wieder festgestellt, daß das auf irgendeine Weise ausgefällte Enzym nie mit Wasser, sondern immer nur mit Salzlösungen — am besten Phosphat — wieder in Lösung zu bringen war.

Häufig blieb sogar hierbei ein nicht unbeachtlicher, offenbar denaturierter Anteil ungelöst zurück.

IV. Kinetik.

1. Nitratreduktion.

Die Mehrzahl der kinetischen Untersuchungen wurde am früher (S. 247) gegebenen „Normalansatz" durchgeführt, in dem nach Bedarf die eine oder andere Komponente variiert

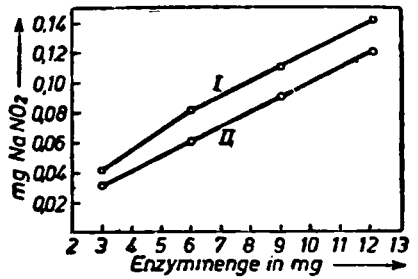


Fig. 1. *Einfluß der Enzymkonzentration*
I = colorimetrisch, *II* = manometrisch bestimmt.

wurde. Wir überzeugten uns zunächst mit Hilfe der späterhin fast ausschließlich angewandten colorimetrischen Methode (S. 246) davon, daß zwischen $^1/_2$ und $2^1/_2$ Stunden *lineare Abhängigkeit der Nitritbildung von der Reaktionszeit* besteht. Für die weiteren Versuche wurden als Reaktionszeit durchweg 2 Stunden gewählt.

Der *Einfluß der Enzymkonzentration* geht aus vorstehender Fig. 1 hervor, in welcher die im Normalansatz gebildete Nitritmenge gegen die Enzymmenge aufgetragen ist. Die Versuchsreihe diente zugleich zum Vergleich der colorimetrischen (Kurve I) mit der manometrischen Methode (Kurve II). In befriedigender Übereinstimmung beider

Methoden (S. 247) ergibt sich im untersuchten Konzentrationsgebiet sehr annähernde Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Fermentkonzentration.

Bei noch größeren Fermentmengen scheint diese Proportionalität nicht mehr zu bestehen, indem dann, wie auch Smorodinzew (a. a. O., S. 243) angibt, die Nitritbildung stark hinter der Zunahme der Enzymmenge zurückbleibt (vgl. auch S. 255); allerdings ergibt die colorimetrische Methode bei den auftretenden großen Farbintensitäten keine zuverlässigen Werte mehr.

Bei *Änderung der Substratkonzentration* im Normalansatz wurden für Acetaldehyd und Crotonaldehyd die Aktivitätskurven I und II der Fig. 2 erhalten.

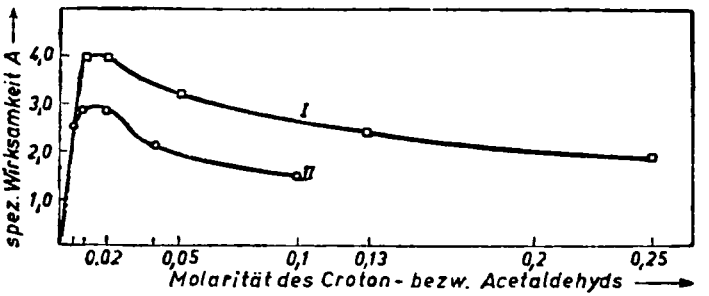


Fig. 2. *Einfluß der Substratkonzentration*
I bei Acetaldehyd, *II* bei Crotonaldehyd.

Für beide Aldehyde liegt das Konzentrationsoptimum in der Nähe von $^{m}/_{100}$, das Verhältnis ihrer optimalen Dehydrierungsgeschwindigkeiten ist etwa 3 : 4, ähnlich wie bei der Leber-aldehydrase (a. a. O., S. 243). Die Substrataffinität des pflanzlichen Enzyms erweist sich hingegen 4—5-mal größer als die des tierischen[1]). Der Hemmungseffekt höherer Aldehydkonzentrationen tritt bei beiden wieder in ähnlicher Weise auf[1]).

Die *p_H-Abhängigkeit der Aldehydrasewirkung* ist bereits von Bernheim und Michlin (a. a. O., S. 244) untersucht worden, wobei ein Aktivitätsbereich zwischen p_H 3 und 8,6 sowie ein Optimum bei p_H 5,5 bzw. 5,9 ermittelt wurde.

[1]) H. Wieland u. Rosenfeld, A. 477, 32 (1930).

Wir stellten ergänzend fest, daß die Lage der Aktivitäts-p_H-Kurve und insbesondere des Optimums stark durch die Wahl des *Puffers* beeinflußt wird, wie die folgende Fig. 3 dartut.

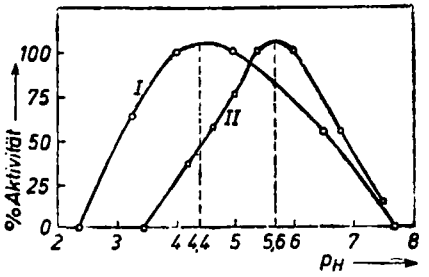


Fig. 3. *Aktivitäts-p_H-Kurve*
I mit Veronal-Acetat-Puffer, *II* mit Phosphat-Citronensäure-Puffer[1]).

Der *Einfluß der Temperatur* ist in Fig. 4 zur Darstellung gebracht. Der Temperaturkoeffizient A_{t+10}/A_t sinkt von 3,0 zwischen 10 und 20° auf 1,4 zwischen 30 und 40° ab; das Temperaturoptimum der Reaktion liegt bei 40°.

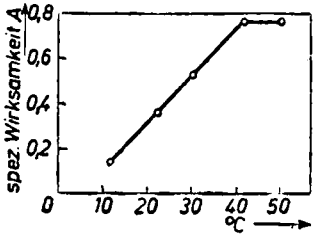


Fig. 4. *Temperaturabhängigkeit.*

2. Methylenblaureduktion.

Die Prüfung der Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und *Enzymkonzentration* erfolgte im „Normalansatz" der S. 247 unter Pufferung mit Borat-HCl-Gemisch von p_H 8,7, wobei diesmal erheblich höhere Enzymmengen zur

[1]) Vgl. z. B. Bamann-Myrbäck, Meth. d. Fermentforsch. I, 760f. (Leipzig 1941).

Anwendung kommen konnten als in den Nitratversuchen (Fig. 5).

Wie Fig. 5 zeigt, schließt sich an ein Gebiet, in dem auch hier annähernde Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Umsatzgeschwindigkeit herrscht, ein solches an, in dem letztere von der Enzymmenge unabhängig wird. Dieses Verhalten ist überraschend, besonders im Hinblick auf die Homogenität des Systems, findet sich aber in ähnlicher Weise z. B. bei der pflanzlichen Oxaloxhydrase[1]). Eine befriedigende Erklärung kann einstweilen nicht gegeben werden. Es erscheint immerhin denkbar, daß die Bildung eines reversiblen

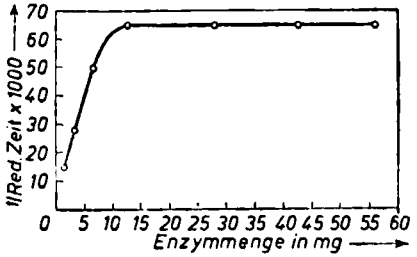


Fig. 5. *Einfluß der Enzymkonzentration im Methylenblauversuch*

Ferment-Hemmungskörper-Komplexes bei höherer Enzymkonzentration die Zunahme der Entfärbungsgeschwindigkeit mit steigender Enzymmenge gerade kompensiert.

Jedenfalls ergibt sich die Notwendigkeit, bei Aktivitätsbestimmungen nach der Methylenblaumethode die Enzymmenge so zu wählen, daß man sich im linear ansteigenden Ast der Aktivitätskurve befindet.

Die Abhängigkeit der Enzymwirkung von der *Substratkonzentration* ist — von einer etwas breiteren optimalen Zone zwischen $^{m}/_{200}$ und $^{m}/_{40}$ abgesehen — im wesentlichen die schon im Nitratversuch (S. 253) festgestellte.

Hingegen zeigen sich in der p_H-*Abhängigkeit* sehr erhebliche Unterschiede zwischen Methylenblau- und Nitratreaktion, auf die grundsätzlich schon Bernheim aufmerksam gemacht

[1]) W. Franke u. Hasse, H. 249, 231 (1937).

hat; allerdings weicht die von uns gefundene und wiederholt reproduzierte Aktivitäts-p_H-Kurve der Methylenblaureduktion wieder stark von der Bernheimschen ab, wie dies in Fig. 6 zum Ausdruck kommt.

Die von uns gefundene p_H-Abhängigkeit entspricht der bei Dehydrasen meist beobachteten[1]). Eine Diskontinuität der Aktivitätskurve, wie sie Bernheim angegeben und durch das Vorliegen einer enzymatischen und einer *nicht*enzymatischen Farbstoffreduktion — letztere oberhalb p_H 8 stattfindend — interpretiert hatte, konnten wir nie feststellen.

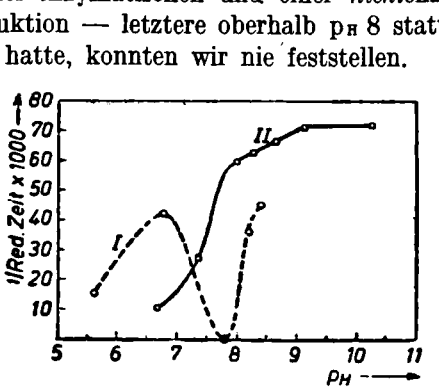


Fig. 6. *Aktivitäts-p_H-Kurve der Methylenblauversuche*
I nach Bernheim, *II* nach eigenen Versuchen (mit Boratpuffer).

Um ganz sicher zu sein, daß die Methylenblauentfärbung bei Gegenwart von Acetaldehyd auch im alkalischen Gebiet einen rein *enzymatischen* Vorgang darstellt, wurden einige Kontrollversuche mit *gekochtem* Ferment durchgeführt, die in Tab. 3 zusammengestellt sind.

Tabelle 3.

p_H	Substrat	Entfärbungszeiten	
		mit gekochtem Enzym	mit nicht gekochtem Enzym
7,1	$^m/_{10}$-Acetaldehyd	> 1440 Minuten	41 Minuten
8,8	,, ,,	~ 360 ,,	15 ,,
8,8	ohne ,,	> 1440 ,,	> 1440 ,,
10,3	$^m/_{10}$- ,,	~ 300 ,,	14 ,,

[1]) Vgl. z. B. W. Franke bei H. v. Euler, Die Katalasen und die Enzyme der Oxydation und Reduktion, S. 495ff. (München 1934).

Die nichtenzymatische Reaktion erweist sich demnach als so unerheblich, daß sie gegenüber der enzymatischen vollkommen vernachlässigt werden kann.

V. Zur Charakteristik des gereinigten Enzyms.

Die Kartoffel-aldehydrase ist, soweit sich nach dem bis jetzt erreichten Reinheitsgrad beurteilen läßt, offenbar ein *Globulin*, wofür kennzeichnend ist

a) die Unlöslichkeit in Wasser, weshalb sie bei der Dialyse gegen destilliertes Wasser aus ihren Lösungen ausfällt,

b) die Leichtlöslichkeit in Salzlösungen.

Am geeignetsten zu Lösungszwecken erweisen sich schwach alkalische Lösungen, z. B. sekundäres Phosphat, aus denen das Enzym beim Ansäuern wieder ausfällt. Sein *isoelektrischer Punkt* liegt — nach orientierenden Fällungsversuchen bei verschiedenem p_H — zwischen p_H 4,0 und 4,5.

Die Löslichkeit in wasserhaltigem *Glycerin* ist unbedeutend.

Durch *organische Solventien* (Aceton, Methylalkohol) wird das Ferment auch bei tiefen Temperaturen (-10^0) innerhalb kurzer Zeit stark geschädigt.

Eines *dialysierbaren Co-Ferments* bedarf die Aldehydrase nach unseren Reinigungsversuchen offenbar nicht.

Was die *Stabilität* des Enzyms beim Aufbewahren betrifft, so fanden wir, daß die Aktivität einer durch Dialyse und Ammonsulfatfällung gereinigten Enzym-Phosphat-lösung von p_H 7,5 bei 4^0 im Verlaufe von 4 Wochen um die Hälfte sank. Der gleiche Aktivitätsverlust tritt schon nach 12 Stunden ein, wenn man das durch halbgesättigte Ammonsulfatlösung ausgefällte Enzym unter dieser im Eisschrank von 4^0 aufbewahrt.

Über die p_H-*Stabilität* der pflanzlichen Aldehydrase unterrichtet Fig. 7.

Das Enzym wurde jeweils 10 Minuten in Citratpuffer bei dem mit der Wasserstoffelektrode kontrollierten p_H inkubiert und anschließend nach Einstellung des p_H-Wertes 5,5 und Zugabe von Aldehyd die Aktivität nach der Nitratmethode bestimmt.

Wie ersichtlich, ist das Enzym gegen verdünnte Säure sehr empfindlich, gegen verdünntes Alkali unempfindlich, was gerade bei einem *Pflanzen*enzym und in Anbetracht der

bekannten Alkaliempfindlichkeit des Schardinger-Enzyms[1]) überrascht.

Der Vergleich mit Fig. 3 (S. 254) legt nahe, daß der Abfall der Aktivitäts-p_H-Kurve nur auf der *sauren* Seite durch *irreversible* Enzymschädigung bedingt ist, während derjenige nach der *alkalischen* Seite zu auf *reversible* Faktoren — etwa den Ladungszustand des Fermentmoleküls[2]) zurückgeht. Die Verhältnisse liegen genau umgekehrt wie im eingehend studierten Fall der tierischen *Tyraminoxydase*[3]).

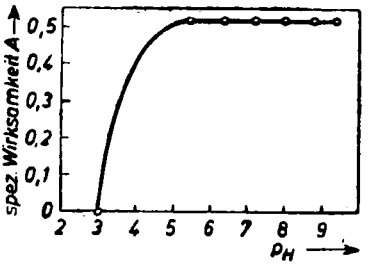


Fig. 7. *p_H-Stabilität der Aldehydrase.*

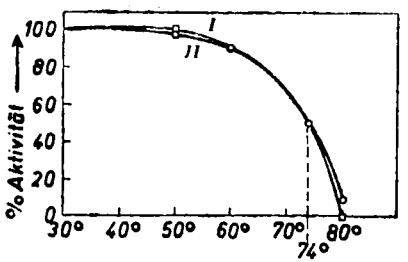


Fig. 8. *Thermostabilität der Aldehydrase*
I nach der Nitrat-, *II* nach der Methylenblaumethode bestimmt.

Die *Thermostabilität* des Ferments wurde sowohl nach der Nitrat- als auch nach der Methylenblaumethode bestimmt (Fig. 8). Beide Meßreihen ergaben übereinstimmend die für

[1]) M. Dixon u. Thurlow, Bio. J. 18, 976 (1924). — D. Michlin, Bio. Z. 202, 329 (1928).

[2]) Vgl. die Theorie von B. Woolf, Bio. J. 25, 342 (1931). — Ferner R. P. Cook u. Alcock, Bio. J. 25, 523 (1931).

[3]) M. L. C. Bernheim-Hare, Bio. J. 22, 968 (1928).

eine Dehydrase recht hohe „Tötungstemperatur" [nach v. Euler[1])] von 74°.

Definitionsgemäß wurde bei optimalem p_H (5,5 mit Phosphat-Citronensäure bzw. 8,7 mit Borat-HCl) $^1/_2$ Stunde auf die betreffende Temperatur erwärmt und dann bei 30° nach Zugabe von Acceptor und Aldehyd in den üblichen Konzentrationen die Aktivitätsbestimmung vorgenommen.

Zur Orientierung sei erwähnt, daß nur zwei typische Aerodehydrasen — Glucose- und Oxaloxhydrase — fast gleiche (73°) bzw. höhere (90°) Tötungstemperaturen aufweisen[2, 3]).

VI. Versuche zur Acceptorspezifität.

1. Chinoide Farbstoffe und Chinon.

Bernheim (a. a. O., S. 244) hat zwar schon beigegeben, daß außer Methylenblau auch gewisse Derivate der Indigo- und der Indophenolreihe sowie Chinon als Acceptoren der pflanzlichen Aldehydrase zu fungieren vermögen. Die von ihm beobachteten vielstündigen Entfärbungszeiten (3—18 Stunden) schließen aber einerseits die Möglichkeit bakterieller Infektionen, andererseits die der Enzymschädigung ein. Es schien uns daher von Interesse, derartige Acceptorversuche mit unseren offenbar weit aktiveren Enzymlösungen unter sauberen Versuchsbedingungen zu wiederholen.

In der folgenden Tab. 4 sind die Entfärbungszeiten nebst den „Normalpotentialen" E_0' verschiedener *Farbstoffe* bei p_H 7 zusammengestellt.

Die Ansätze enthielten:

1 ccm Enzymlösung
2 ccm $^m/_7$-Veronal-Acetat-Puffer (p_H 7,6)
1 ccm $^m/_{2000}$-Farbstofflösung
1 ccm $^m/_{10}$-Crotonaldehyd.

Die substratfreien Kontrollen waren auch nach 24 Stunden noch nicht entfärbt.

---

[1]) H. v. Euler, Allgem. Chemie d. Enzyme, S. 272 (München 1925).
[2]) D. Müller, Bio. Z. 205, 127 (1929).
[3]) W. Franke u. Schumann, unveröffentlicht.

Tabelle 5.

Acceptor-farbstoff	E_0'	Entfärbungszeit (in Min.)
2,6-Dichlorphenol-indophenol	0,217	25
Toluylenblau	0,115	23
Methylenblau	0,011	105
Pyocyanin	− 0,034	200
Indigo-disulfonat.	− 0,125	>200
Safranin T	− 0,289	>200

Während Bernheim aus seinen Ergebnissen folgerte, daß die Entfärbungszeiten vom Potential des verwendeten Farbstoffs unabhängig seien, folgen sie in unseren Versuchen im wesentlichen den Redoxpotentialen, wie dies neuerdings auch für andere Dehydrasen [z. B. die Glucose-oxhydrase[1])] nachgewiesen ist.

Die von Bernheim aus potentiometrischen Versuchen erschlossene Acceptoreigenschaft des *Chinons* konnten wir mit titrimetrischer Methodik nicht bestätigen.

Die verwendeten Ansätze enthielten:

1 ccm Enzymlösung (im Methylenblauversuch auf Aktivität geprüft)
2 ccm $^m/_5$-Phosphat-Citronensäure-Puffer (p_H 7,5)
1 ccm $^m/_{10}$-Chinon
1 ccm $^m/_{10}$-Acetaldehyd.

Nach verschieden langer Inkubation in evakuierten Thunberg-Röhrchen bei 30° wurde mit 5 ccm 2 n-H_2SO_4 und 5 ccm 10-proc. KJ-Lösung versetzt, 15 Minuten stehengelassen und das ausgeschiedene Jod mit Thiosulfat titriert. Das Resultat der Versuche gibt Tab. 6 wieder.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist der Chinonverbrauch schon ohne Substrat nicht unerheblich; ausschlaggebend ist indes der Befund, daß im vollständigen Ansatz mit *gekochtem* Enzym (Enzymlösung zur Trockne eingedampft und durch Wasserzugabe wieder auf das ursprüngliche Volumen gebracht) fast dieselben und im Vergleich zur substratfreien Kontrolle beträchtlich erhöhten Chinonschwunde beobachtet werden wie mit unvorbehandeltem Enzym. Wir halten hierdurch die Bernheimschen Versuche, die im übrigen nur eine *Abnahme*

[1]) W. Franke u. Deffner, A. 541, 117 (1939).

des Chinons[1]), nicht dessen *Acceptoreigenschaft* beweisen, für widerlegt. Für die Ursache des Versagens von Chinon — das nach früheren Erfahrungen mit diesem Acceptor eigentlich überraschend kommt[2]) — geben spätere eigene Beobachtungen (S. 267) einen Hinweis.

Tabelle 6.

Ansatz	Reaktionszeit (in Minuten)	ccm $^n/_{10}$-Chinon noch vorhanden
Enzym + Aldehyd	10	0,62
„ gekocht + Aldehyd		0,60
„ allein		0,80
Enzym + Aldehyd	15	0,48
„ gekocht + Aldehyd		0,46
„ allein		0,74
Enzym + Aldehyd	30	0,32
„ gekocht + Aldehyd		0,38
„ allein		0,58
Enzym + Aldehyd	60	0,08
„ gekocht + Aldehyd		0,12
„ allein		0,56

2. Sauerstoff.

In der Frage nach der Verwertbarkeit des *Sauerstoffs* als Acceptor konnten auch wir zu keiner endgültigen Klarheit kommen. Mit Sicherheit ließ sich hingegen feststellen — im Widerspruch zu den Angaben Smorodinzews und im Einklang mit denjenigen Bernheims —, daß Sauerstoff unter gewissen Bedingungen stark schädigend wirkt. Da diese Schädigung auch im Nitrat- und Methylenblautest auftritt, kann fehlender Sauerstoffverbrauch naturgemäß in doppelter Weise interpretiert werden: als Folge der Inaktivierung und als typische Enzymeigenschaft.

Die Versuchsreihen der Tab. 7 und 8 sollen den Einfluß vorausgehenden Luftzutritts auf den Ausfall der Aktivitätsbestimmung nach der Nitrat- und nach der Methylenblaumethode belegen.

---

[1]) Etwa durch Reaktion mit Aminosäuren bzw. Protein; vgl. hierzu W. Franke, A. 480, 1 (1930).

[2]) Vgl. z. B. W. Franke u. Lorenz, A. 532, 1 (1937).

Tabelle 7.

Nitrattest

Grundansatz (p_H 5,5)	1 Std. Inkubation vor d. Test	mg $NaNO_2$ im anaerob. Test mit 1 ccm $^m/_3$-$NaNO_3$ gef.
0,5 ccm Enzymlösung . . 2,0 ccm $^m/_5$-Puffer [1]) . . . 1,0 ccm Wasser	anaerob	0,15
0,5 ccm Enzymlösung . . 2,0 ccm $^m/_5$-Puffer . . . . 1,0 ccm Wasser	aerob	0,14
0,5 ccm Enzymlösung . . 2,0 ccm $^m/_5$-Puffer . . . . 1,0 ccm $^m/_{10}$-Crotonaldehyd	anaerob	0,13
0,5 ccm Enzymlösung . . . 2,0 ccm $^m/_5$-Puffer . . . . 1,0 ccm $^m/_{10}$-Crotonaldehyd	aerob	0,07

Hierher gehört auch die Beobachtung, daß eine nach der Nitratmethode *unter Luftzutritt* ausgeführte Aktivitätsbestimmung nur etwa $^1/_3$ der *im Vakuum* gefundenen enzymatischen Aktivität liefert.

Tabelle 8.

Methylenblautest.

Grundansatz (p_H 8,3)	Zusatz nach $^1/_4$-stündigem Luftdurchleiten	Entfärbungszeit (in Minuten)
2,0 ccm $^m/_5$-Puffer [2]) . . 1,0 „ $^m/_{10}$-Acetaldehyd	1,0 ccm Enzymlösung . 0,5 „ Methylenblau . 1 : 5000	28
1,0 „ Enzymlösung . . 2,0 „ $^m/_5$-Puffer . . .	0,5 „ Methylenblau . 1 : 5000 1,0 „ $^m/_{10}$-Acetaldehyd	26
1,0 „ Enzymlösung . . 2,0 „ $^m/_5$-Puffer . . . 1,0 „ $^m/_{10}$-Acetaldehyd	0,5 „ Methylenblau . 1 : 5000	90

Die angestellten Versuche beweisen, daß Enzyminaktivierung nur dann eintritt, wenn Sauerstoff und Aldehyd *gleichzeitig* anwesend sind. Es liegt nahe, an die spurenweise Bildung eines hoch aktiven Aldehydperoxyds zu denken, um so mehr,

[1]) Phosphat-Citronensäure. [2]) Borat-HCl.

als das Enzympräparat katalasehaltig und Hydroperoxydbildung nicht nachweisbar ist.

Die manometrische Messung der Sauerstoffaufnahme in der Warburg-Apparatur ergab auch bei Variation des p_H-Wertes nur minimale Absorptionen.

Dies geht aus Tab. 9 hervor, in der die O_2-Aufnahmen bei 30° in Kubikmillimeter verzeichnet sind.

Tabelle 9.

Zeit in Min.	1 ccm Enzymlösung + 2 ccm $^m/_{10}$-Acetaldehyd		
	+ 2 ccm $^m/_5$-Puffer[1]) p_H 6,0	+ 2 ccm $^m/_5$-Puffer[1]) p_H 6,6	+ 2 ccm $^m/_5$-Puffer[2]) p_H 8,2
5	0	13	9
10	3	17	10
15	3	18	10
30	6	20	12
60	9	20	13
90	10	20	15
120	12	20	16
150	12	20	16

Kontrollen mit gekochtem Enzym liefen zur Ermittlung der Korrektionen stets mit. Da auch dem höchsten O_2-Wert der Tab. 9 nur ein Manometerausschlag von 5—6 mm Wasser entspricht, ist die Genauigkeit der Angaben natürlich begrenzt.

Zusatz von Leber-katalase verbesserte das Ergebnis nicht.

Erklären sich die minimalen O_2-Aufnahmen durch Fermentschädigung, dann ist diese jedenfalls von anderer Natur als die beim Schardinger-Enzym beobachtete und auf H_2O_2-Bildung zurückgeführte[3]). Sie ist auch von anderer Art als die von Wieland und Sutter[4]) bei pflanzlichen Polyphenoloxydasen gefundene, die in Abwesenheit von Substrat stärker auftritt als in dessen Gegenwart.

Da bisher bei Unfähigkeit eines Ferments zur Sauerstoffreaktion nur in Ausnahmefällen auf Fermentschädigung

[1]) Phosphat-Citronensäure. [2]) Borat-HCl.

[3]) M. Dixon, Bio. J. 19, 175 (1925). — H. Wieland u. Mitarbeiter, A. 477, 32 (1929); 488, 217 (1930).

[4]) B. 63, 66 (1930).

geprüft worden ist und die Zulässigkeit dieser Erklärung auch im vorliegenden Falle nicht einwandfrei erwiesen ist, soll die pflanzliche Aldehydrase einstweilen ex eventu als *Anaerodehydrase* im System der desmolytischen Fermente[1]) geführt werden.

3. Zur Frage der Einheitlichkeit von nitrat- und methylenblaureduzierendem Enzym.

Der erhebliche Unterschied in der p_H-Abhängigkeit von Nitrat- und Methylenblaureaktion legt die Vermutung nahe, daß es sich um ein komplexes Fermentsystem handeln könnte, da die Annahme eines Gemisches zweier streng acceptorspezifischen Aldehydrasen wohl nur geringe Wahrscheinlichkeit für sich hat.

Die Frage, ob hier zwei verschiedene Enzyme vorlägen, hat schon Bernheim durch gleichzeitige Anwendung beider Acceptoren nach dem Prinzip der „kompetitiven Hemmung" zu beantworten versucht. Die von ihm beobachtete Verlängerung der Methylenblau-entfärbungszeit in Gegenwart von Nitrat liegt aber innerhalb der Fehlergrenzen der Methodik, so daß sein Schluß auf Einheitlichkeit des Enzyms nicht stichhaltig ist.

Eigene orientierende Versuche, mit Hilfe von Dialyse, Ammonsulfatfällung und selektiver Adsorption eine Aufteilung der Aldehydrase in Nitrat- und Methylenblau-komponente durchzuführen, lieferten kein eindeutiges Resultat.

Als zweites Kriterium zur Entscheidung der Frage nach der Einheitlichkeit der Aldehydrase wurde das Verhältnis der Wirksamkeiten gegen Nitrat und Methylenblau in Enzymlösungen aus verschiedenen Kartoffelsorten herangezogen. Das Ergebnis enthält Tab. 10.

Die an sich wünschenswerte Bestimmung des Aktivitätsverhältnisses in Kartoffel-*rohextrakten* ließ sich infolge deren erheblicher Eigenreduktion im Methylenblauversuch nicht durchführen, weshalb in allen Fällen durch Dialyse und Ammonsulfatfällung *gereinigte* Fermentlösungen verwendet wurden. Um sicher zu sein, daß man im Gebiet der Proportionalität zwischen Enzymmenge und Umsatzgeschwindigkeit arbeitete (vgl.

[1]) Zur Fermentsystematik vgl. z. B. W. Franke bei Nord-Weidenhagen, Handbuch d. Enzymologie, S. 673ff. (Leipzig 1940); ferner Fußnote [3]), S. 243.

S. 253 und 255), wurden stets wenigstens zwei verschiedene Fermentkonzentrationen geprüft.

In Tab. 10 sind die durch jeweils 0,5 ccm Enzymlösung von bestimmtem Trockengewicht in „Normalversuchen" (S. 246/247) gebildete Nitritmenge und die damit beobachtete Entfärbungszeit einander gegenübergestellt; die letzte Spalte enthält den Quotienten von Nitritbildungs- und Entfärbungsgeschwindigkeit.

Tabelle 10.

mg Trockengew. i. 0,5 ccm Enzymlösung	*Nitratreduktion* bei p_H 5,5. mg $NaNO_2$ gebildet	*Methylenblaureduktion* bei p_H 8,5. Entfärbungszeit t (Min.)	$\frac{\text{mg } NaNO_2}{1/t}$.
14	0,05	15	$\frac{0{,}05}{1/15} = 0{,}75$
11	0,07	15	$\frac{0{,}07}{1/15} = 0{,}05$
2	0,02	67	$\frac{0{,}02}{1/67} = 1{,}30$
2,5	0,08	26	$\frac{0{,}08}{1/26} = 2{,}1$
3,5	0,10	25	$\frac{0{,}1}{1/25} = 2{,}5$
1	0,03	99	$\frac{0{,}03}{1/99} = 3{,}0$
1	0,05	82	$\frac{0{,}05}{1/82} = 4{,}1$
2,5	0,08	60	$\frac{0{,}08}{1/60} = 4{,}8$
9,5	0,07	86	$\frac{0{,}07}{1/86} = 6{,}0$
7,5	0,06	200	$\frac{0{,}06}{1/200} = 12{,}0$

Selbst unter Berücksichtigung des beschränkten Wertes längerdauernder Entfärbungsversuche für Aktivitätsbestimmungen (Enzymschädigung usw.) steht die beträchtliche Variation des Geschwindigkeitsverhältnisses von Nitrat- und Methylenblaureduktion um wenigstens eine Größenordnung außer Zweifel. Dabei ist noch die Tatsache zu berücksichtigen, daß der letzte Versuch der obigen Reihe typisch ist für rund die Hälfte aller untersuchten Enzymlösungen verschiedener Herkunft. Die Verhältnisse lassen sich wohl einstweilen am

einfachsten durch die Annahme erklären, daß für das Zustandekommen der Methylenblaureduktion ein noch unbekannter *Zusatzfaktor* zur „Nitratreduktase" hinzutreten muß.

Wir vermuteten, daß vielleicht *Codehydrase I* (Cozymase) — bei der Dialyse des Rohextrakts entfernt — diesen „Aktivator" darstelle. Doch war der Zusatz von 0,5 mg[1]) eines nach v. Euler, Albers und Schlenk[2]) dargestellten Präparats vom Reinheitsgrad 0,4 auf die Entfärbungsgeschwindigkeit des Methylenblaus — sie betrug ohne Zusatz 25 Minuten — ohne jeden Einfluß.

Dieses Versagen der Cozymase konnte nun darauf beruhen, daß in dem gereinigten Fermentsystem außerdem noch die Dehydrase der Dihydro-cozymase, die *Diaphorase*, fehlte, die nach der heutigen Auffassung[3]) den Wasserstoff des Dihydro-co-ferments auf Acceptoren von der Art des Methylenblaus überträgt. Aber auch Zugabe von 10 mg eines *Diaphorase*-präparats — nach der Vorschrift von Haas[4]) bis zu Stufe 3 gereinigt — änderte die Entfärbungszeit mit und ohne Cozymasezusatz nicht.

VII. Beeinflussung der Aldehydrase durch verschiedene Stoffe.

Versuche der genannten Art wurden zur schärferen Charakterisierung der in mancher Hinsicht noch nicht ganz geklärten Stellung des Kartoffelenzyms unter den Dehydrasen angestellt; sie schienen um so wünschenswerter, als von typischen „Effektoren" der Enzymreaktion bisher nur die *Blausäure* näher geprüft worden ist.

Zum genannten Zwecke wurden zunächst charakteristische Inhibitorgruppen untersucht, und zwar in „Normalversuchen" sowohl der Nitrat- als auch zum Teil der Methylenblaureduktion, dies in der Hoffnung, die oben geäußerten Vermutungen über das Verhältnis beider Reaktionsformen doch noch in der einen oder anderen Richtung näher präzisieren zu können. Diese Erwartung hat sich allerdings nicht erfüllt.

Die nachfolgenden beiden Tabellen fassen das Ergebnis dieser Versuche übersichtlich zusammen.

---

[1]) Zur Dosierung vgl. F. Lynen u. Franke, H. 270, 271 (1941).
[2]) H. 240, 113 (1936); 246, 6 (1937).
[3]) Vgl. z. B. W. Franke, Fußnote 1, S. 264.
[4]) Bio. Z. 298, 378 (1938).

Tabelle 11.

Nitratreduktion (p_H 5,4).

Inhibitorgruppe	Inhibitor	Konzentration bzw. Menge in 5 ccm	mg $NaNO_2$ gefunden	Proc. Hemmung
—	—	—	0,08	—
Schwermetallkomplexbildner	HCN	$^m/_{2000}$	0,06	25
	,,	$^m/_{1000}$	0,05	38
	,,	$^m/_{500}$	0,04	50
	H_2S	$^m/_{500}$	0	?
	NaN_3	$^m/_{500}$	0	100
	CO	1 Atm.	0,08	0
	$K_4P_2O_7$	$^m/_{50}$	0,06	25
	8-Oxychinolin-5-sulfosäure	$^m/_{100}$	0,06	25
Spezifische Dehydrasegifte	NaF	$^m/_{50}$	0,08	0
	Na-Jodacetat	$^m/_{1000}$	0,03	63
	,,	$^m/_{100}$	0	100
Unspezifische Dehydrasegifte (Narcotica)	Phenylurethan	$^m/_{200}$	0,08	0
	Phenylharnstoff	$^m/_{200}$	0,08	0
	Chloralhydrat	$^m/_{10}$	0,08	0
	Octylalkohol	0,1 ccm	0,08	0
	Toluol	0,1 ,,	0,08	0
	Chloroform	0,1 ,,	0,08	0
„Antioxygene“	Chinon	$^m/_{100}$	0	100
	Hydrochinon	$^m/_{100}$	0,03	63
Kontrollversuche *ohne* Enzym				
	0,1 mg $NaNO_2$ + HCN	$^m/_{500}$	0,08	
	0,1 ,, ,, + H_2S	$^m/_{500}$	0	

Beachtlich und für beide Acceptor-reaktionen charakteristisch ist zunächst die schon von Bernheim und Michlin beobachtete *Blausäure*-Empfindlichkeit der pflanzlichen Aldehydrase. Sie tritt beim tierischen Enzym in dieser Form nicht auf und wird unter *anaeroben* Bedingungen bei Dehydrasen überhaupt nur in seltenen Fällen gefunden (z. B. bei der pflanzlichen Formico-dehydrase[1]) und der tierischen Fettsäure-dehydrase)[2]). Wenngleich die Hemmungseffekte kleiner sind als bei den typischen Oxydasen, könnte man doch

[1]) E. Adler u. Sreenivasaya, H. 249, 24 (1937).
[2]) K. Lang, H. 261, 240 (1939).

an einen *Schwermetallgehalt* der pflanzlichen Aldehydrase denken, dies um so mehr, als auch *Azid* im schwach *sauren* Milieu der Nitratansätze stark hemmend wirkt; die fehlende Hemmung der Methylenblaureduktion besagt nichts, da im *Neutral*gebiet auch typische Schwermetallkatalysen durch Azid nicht beeinflußt werden[1]). Ohne Beweiskraft sind auch die Versuche mit *Schwefelwasserstoff*, dessen reduzierende Wirkung eventuell vorhandene Hemmungseffekte überdeckt.

Tabelle 12.

Methylenblaureduktion (p_H 8,6).

Inhibitorgruppe	Inhibitor	Konzentrat. bzw. Menge in 5 ccm	Entfärbungszeit (Min.)	Proc. Hemmung
—	—	—	15	—
Schwermetallkomplexbildner	HCN	$^m/_{2000}$	25	40
	,,	$^m/_{1000}$	35	57
	,,	$^m/_{500}$	50	70
	H_2S	$^m/_{500}$	etwa 2	?
	NaN_3	$^m/_{500}$	14	0
	$K_4P_2O_7$	$^m/_{50}$	15	0
Spezifische Dehydrasegifte	NaF	$^m/_{50}$	16	0
Unspezifische Dehydrasegifte (Narcotica)	Phenylurethan	$^m/_{200}$	15	0
	Chloralhydrat	$^m/_{10}$	22	30
	Octylalkohol	0,1 ccm	15	0
	Toluol	0,1 ,,	15	0
	Chloroform	0,1 ,,	16	0
Kontrollversuche *ohne* Enzym				
	H_2S	$^m/_{500}$	etwa 2	

Interessanterweise ist auch die neuerdings von Yamagata[2]) isolierte *Nitratreduktase aus Bakterien* HCN-empfindlich, so daß wir zeitweilig an Beziehungen zwischen diesem Enzym und unserer Aldehydrase dachten. Durch einen äußeren Umstand wurden wir zu einigen orientierenden Versuchen in der genannten Richtung veranlaßt. Läßt man Kartoffelrohextrakt 1—2 Tage bei Zimmertemperatur stehen, so scheidet sich unter leichter Säuerung ein intensiv nitratreduzierender Niederschlag ab, den wir anfangs für aktives Kartoffelenzym hielten. Er besteht aber bei mikroskopischer Prüfung zum größten Teil aus Bakterien, die sich beim

[1]) D. Keilin, Proc. Roy. Soc. (B) **121**, 165 (1936).

[2]) Acta phytochim. **10**, 283 (1938); **11**, 145 (1939).

Ausstreichen auf Bouillon-Agar ziemlich leicht in Reinkultur (kurze, dicke, nichtsporenbildende Stäbchen) gewinnen lassen. In der üblichen Weise auf demselben Nährboden präparativ durchgeführte Züchtungsversuche[1]) lieferten ein einheitliches Zellmaterial von hohem Nitratreduktionsvermögen, das aber im Gegensatz zu dem des Kartoffelenzyms nicht donatorspezifisch ist, sondern sich in Gegenwart unterschiedlicher Substrate (Glucose, Lactat, Malat usw.) äußert. Da zudem Aldehyd die (beträchtliche) Eigen-Nitratreduktion des Bakteriums deutlich hemmt, scheinen Bakterien- und Pflanzenenzym nicht näher verwandt zu sein.

Unter den spezifischen Dehydrasegiften fällt die starke Hemmung durch *Jodessigsäure* auf, die im hier beobachteten Ausmaß bisher nur bei der Alkohol- und der Triosephosphatdehydrase sowie der Aldehyd-mutase festgestellt worden ist[2]).

Die unspezifischen *Narcotica* als typische Dehydraseinhibitoren erweisen sich hingegen, mit einer wenig belangvollen Ausnahme, als völlig wirkungslos. Bei diesem für eine Dehydrase nicht erwarteten Verhalten ist indes zu berücksichtigen, daß 1. die bisher in der Literatur festgestellten Hemmungseffekte dieser Art sich fast ausschließlich auf *tierische* Dehydrasen beziehen[3]); 2. unter den wenigen bisher eingehender untersuchten *pflanzlichen* Dehydrasen sich einige von geringer (Glutamino- und Citricodehydrase[4]) Glucoseaerodehydrase[5]), ja praktisch fehlender Narkotisierbarkeit (Oxalo-aerodehydrase)[6]) befinden.

Von Interesse ist schließlich noch die bei der Nitratreaktion festgestellte starke *Chinon*hemmung (neben der etwas schwächeren des *Hydrochinons*), weil sie die Erklärung dafür liefert, warum Chinon der pflanzlichen Aldehydrase nicht als Wasserstoffacceptor zu dienen vermag (S. 260/261).

Bei künftigen weiteren Reinigungsversuchen wird man diesem erst zuletzt entdeckten Umstand in Anbetracht des erheblichen Polyphenol- und Oxydasegehalts der Kartoffelknolle stärkere Beachtung schenken müssen.

---

[1]) Vgl. z. B. W. Franke u. Peris, Bio. Z. **295**, 61 (1937).

[2]) M. Dixon, Nature **140**, 806 (1937).

[3]) Literaturzusammenstellung bei C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, Suppl. II, S. 1560 (Den Haag, 1939).

[4]) Vgl. T. Thunberg, Skand. Arch. Physiol. **75**, 49 (1936).

[5]) W. Franke u. Lorenz, A. **532**, 1 (1937).

[6]) W. Franke u. Hasse, H. **249**, 231 (1937).

Anhangsweise sei noch ein *Aktivierungseffekt* erwähnt, der sich bei der Nitratreduktion auf Zugabe von *SS-Glutathion* in $^{m}/_{100}$-Konzentration beobachten ließ und in einer Steigerung der Nitritbildung um $^{1}/_{3}$ bestand. Im Methylenblauversuch trat die Wirkung allerdings nicht auf, was aber mit den Potentialverhältnissen bzw. dem p_H-Unterschied zusammenhängen könnte. SH-Verbindungen (Glutathion, Cystein, Thioglycolsäure) lieferten infolge Reduktionswirkung kein eindeutiges Resultat, doch scheinen auch bei ihnen gewisse Aktivierungseffekte aufzutreten.

Der *Bayerischen Akademie der Wissenschaften* sind wir für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Untersuchung zu großem Dank verpflichtet.

Zum biologischen Abbau der Essigsäure*).

I. Über die „Induktionszeit" bei verarmter Hefe;

von *Feodor Lynen*.

Mit 22 Figuren im Text.

[Aus dem chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München.]

(Eingelaufen am 31. Juli 1942.)

Inhaltsübersicht.

Versuche mit Alkohol und Glucose („Primäreffekt") 272
Versuche mit Bernsteinsäure („Sekundäreffekt") 279
Der Abbauweg der Essigsäure 285
Die „Induktionszeit" 296
Versuche mit Brenztraubensäure und Milchsäure 298
Besprechung der Ergebnisse 304

Die *Essigsäure* stellt ein wichtiges Zwischenprodukt des biologischen Zucker- und Fettabbaues dar. Im ersten Fall stammt sie aus der Brenztraubensäure, die durch Dehydrierung in Essigsäure übergeht. Dabei kann die Wasserstoffver-

*) Herrn Geheimrat Wieland zum 65. Geburtstag.

schiebung, wie in tierischen Geweben und vielen Bakterien, an der Brenztraubensäure selbst, oder, wie in der Hefe, erst an dem durch Decarboxylierung gebildeten Acetaldehyd einsetzen[1]). Von den Fettsäuren her, gelangt man auf dem Weg der von F. Knoop[2]) aufgefundenen β-Oxydation zur Essigsäure.

Die Frage nach dem Weg des oxydativen Abbaus der Essigsäure ist jedoch noch nicht endgültig geklärt. Wohl haben die Untersuchungen von H. Wieland und R. Sonderhoff[3]) *Bernsteinsäure* und *Citronensäure* als Zwischenprodukte dieser Abbaufolge in der Hefe einwandfrei nachgewiesen, aber über die Reaktionen, die von der Essigsäure zu diesen Intermediärprodukten führen, vor allem was den ersten Angriff der Enzyme auf die Essigsäure betrifft, bestehen noch einige Zweifel. Wieland und Sonderhoff nehmen an, daß der erste Angriff in einer unmittelbaren Dehydrierung von zwei Molekeln Essigsäure zu Bernsteinsäure besteht, und daß die Citronensäure, die aus Essigsäure und Oxalessigsäure, einem Dehydrierungsprodukt der Bernsteinsäure, durch Kondensation entstanden ist, nur die Rolle eines Nebenproduktes spielt. F. Lynen und N. Neciullah[4]) kamen in einer späteren Arbeit dagegen zu der Schlußfolgerung, daß diese Kondensation der Essigsäure zu Citronensäure die Primärreaktion des Abbaus darstellt, und daß die Bernsteinsäure im Zuge des Abbaus aus Citronensäure gebildet wird.

Um möglicherweise eine Entscheidung in dieser Frage treffen zu können, und um ganz allgemein dem Mechanismus des biologischen Acetatabbaues näher zu kommen, wurde das Studium dieser Reaktion in Angriff genommen. Dabei erschien es mir besonders aussichtsreich, durch Anwendung von weitgehend „verarmter" Oberhefe, welche Essigsäure erst nach einer gewissen Induktionszeit umzusetzen vermag, etwas über diese Abbaufolge zu erfahren.

---

[1]) F. Lynen, Naturwiss. **30**, 398 (1942).

[2]) Oxydationen im Tierkörper. Sammlung chemischer Vorträge. Enke, Stuttgart 1931, S. 12; H. 274, 294 (1942).

[3]) A. **499**, 213 (1932).

[4]) A. **541**, 203 (1939).

H. Wieland, O. Probst und M. Crawford[1]) haben gefunden, daß bei Oberhefe, die 15—20 Stunden unter Sauerstoff geschüttelt wurde, die Wirksamkeit gegen Acetat sehr stark verringert ist, und daß erst nach einem mehr oder weniger langen Zeitraum, einer „Induktionszeit", die normale Aktivität zurückkehrt. Gleichzeitig machten die Autoren die Beobachtung, daß diese Induktionszeit durch Spuren von Alkohol sehr stark verkürzt werden kann. Nach Ansicht von Wieland und seinen Mitarbeitern soll die Wirkung des Alkohols darin bestehen, daß „die bei der Dehydrierung des Alkohols intermediär gebildete Essigsäure den Zustand des Enzyms zur Reaktionsbereitschaft hin umgestaltet, eine Wirkung, die von vornherein der Hefe zugefügtes Acetat erst nach einiger Zeit hervorzubringen vermag."

In der vorliegenden Untersuchung wurde Branntweinhefe der Sinner A.-G., Karlsruhe-Grünwinkel benutzt, die in wäßriger Suspension mehrere Stunden unter Sauerstoff geschüttelt, und dabei an Inhaltsstoffen verarmt worden war. Die verarmte Hefe wurde abzentrifugiert und vor den Versuchen in frischem Leitungswasser suspendiert.

Die Atmungsversuche wurden in flachen, etwa 50 ccm fassenden Barcroft-Warburg-Gefäßen durchgeführt. Im allgemeinen enthielten die Versuchsansätze 100 mg Hefe (Feuchtgewicht) und 0,5 ccm $^m/_5$-KH_2PO_4, die mit den entsprechenden Zusätzen und Wasser auf ein Gesamtvolumen von 3,0 ccm, bzw. 2,0 ccm (Fig. 5 und 17) gebracht wurden. Eine Ausnahme machen die Versuche mit Bernsteinsäure-Succinatpuffer (Fig. 8—12), bei denen kein KH_2PO_4 zugesetzt wurde, und die Versuche von Fig. 13, bei denen 200 mg Hefe in Anwendung kamen. Im Hauptraum der Gefäße befand sich jeweils die Hefesuspension und die Pufferlösung, in den Seitengefäßen etwaige Zusätze, die, wenn nichts anderes angegeben, nach Schließen der Manometerhähne eingekippt wurden. Im Gasraum war Luft. Der Einsatz der Gefäße enthielt zur Absorption des Kohlendioxyds Natronlauge und einen Streifen Filtrierpapier. Die Reaktionsgefäße wurden im Thermostaten bei 25° geschüttelt. Im Text zu Fig. 1 ist die Zusammenstellung eines Versuches ausführlich wiedergegeben.

Versuche mit Alkohol und Glucose („Primäreffekt").

Wie aus Fig. 1 zu ersehen ist, vermag diese Hefe, in Bestätigung der Versuche von Wieland, Probst und Craw-

[1]) A. **536**, 55 (1938).

ford, erst nach Ablauf einer Induktionszeit von etwa 4 bis 6 Stunden die zugesetzte Essigsäure mit maximaler Geschwindigkeit zu dehydrieren. *Alkohol* verkürzt diese Induktionszeit, und zwar, je nach der zugesetzten Menge, um verschieden große Beträge. Schon mit 37 γ Alkohol ist eine deutliche

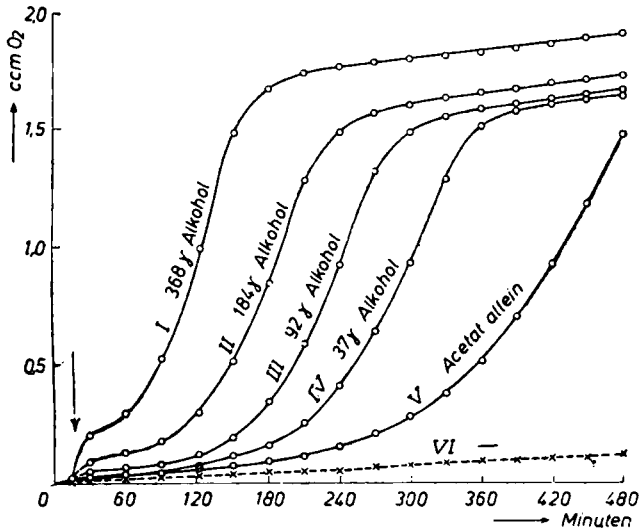


Fig. 1. Wirkung von Alkohol.

Gas: Luft; $T = 25°$; Σ: 3,0 ccm.

Hauptraum: 100 mg Hefe (17 Stunden verarmt) in 1,5 ccm $^m/_{15}$-KH_2PO_4-Lösung.

Seitengefäß:	I	II	III	IV	V	VI
$^m/_2$-Na-Acetat . . .	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—
$^m/_{125}$-Alkohol . . .	1,0	0,5	0,25	0,1	—	—
H_2O	0,4	0,9	1,15	1,3	1,4	1,5

15 Minuten nach Beginn der Ablesungen der Inhalt der Seitengefäße zugekippt (↓).

Wirkung zu sehen, während die 10-fache Menge die Induktionsperiode nahezu vollständig zum Verschwinden bringt. Auf die eigenartige Form der Kurven, die am ausgeprägtesten im Versuch mit der größten Alkoholmenge, aber auch in denen mit 184 und 92 γ Alkohol noch deutlich in Erscheinung tritt, werde ich später S. 289 noch zu sprechen kommen.

Aus Fig. 2 ist zu entnehmen, daß *Glucose* dieselbe Wirkung wie Alkohol hat. Dies war nach der Vorstellung von Wieland

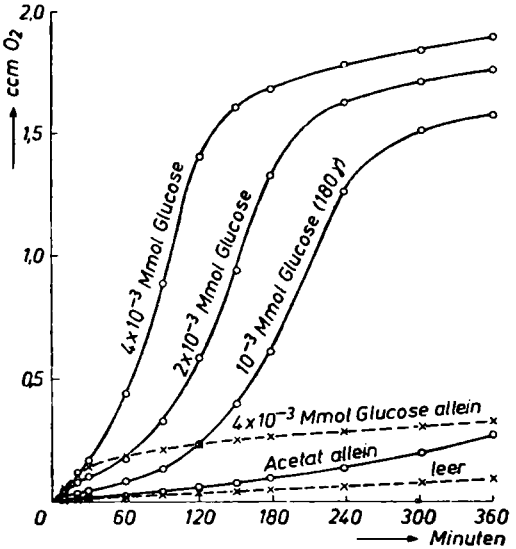
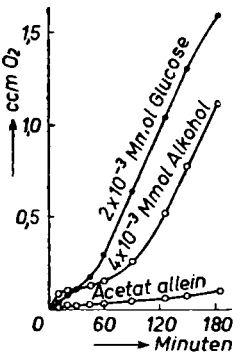


Fig. 2. Wirkung von Glucose.
Bedingungen wie in Fig. 1. Hefe 14 Stunden verarmt.
Mit Zusätzen auf 3 ccm Gesamtvolumen.
o——o $^{m}/_{60}$-Acetat.



Vergleich der Wirkungen von Alkohol und Glucose.
Hefe 20 Stunden verarmt.
$^{m}/_{40}$-Acetat.

Fig. 3

und Mitarbeitern auch zu erwarten. Der Abbauweg des Zuckers mündet ja beim Acetaldehyd in die Reaktionsfolge der

Alkoholdehydrierung ein, so daß aus beiden Nahrungsstoffen dieselbe Essigsäure „in statu nascendi" entsteht, die ja für die Verkürzung der Induktionszeit verantwortlich gemacht wurde. Mit den quantitativen Beziehungen war aber diese Theorie nicht in Einklang zu bringen. Als nämlich die Wirkung von Alkohol und Glucose verglichen wurde (Fig. 3), stellte sich überraschenderweise heraus, daß, in äquivalenten Mengen

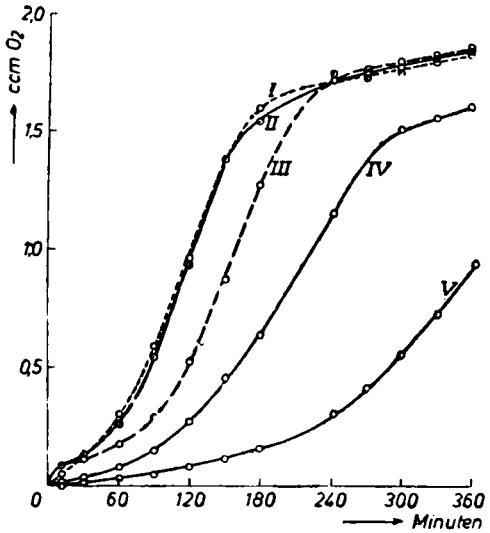


Fig. 4. Vergleich der Wirkungen von Alkohol, Glucose und Milchsäure.

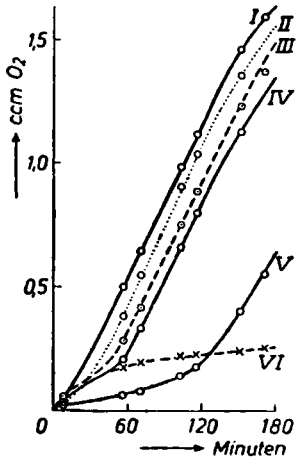
Hefe 16 Stunden verarmt; Acetat $^{m}/_{60}$.

Zusätze: I 2×10^{-3} Mmol Na-Lactat. + 2×10^{-3} Mmol Alkohol. II 2×10^{-3} Mmol Glucose. III 4×10^{-3} Mmol Alkohol. IV 4×10^{-3} Mmol Na-Lactat. V ohne.

angewandt, der Zucker dem Alkohol bei weitem überlegen ist. In diesem Versuch war das molekulare Verhältnis von Glucose zu Äthanol wie 1 : 2 gewählt worden, so daß also aus beiden Substraten die gleiche Menge Essigsäure entstehen mußte. Trotzdem war im Ansatz mit Zucker die maximale Wirksamkeit gegen Acetat schon nach 60 Minuten, im Ansatz

mit Alkohol dagegen erst nach 130 Minuten erreicht. So oft auch dieser Versuch wiederholt wurde, immer lieferte er qualitativ das gleiche Ergebnis. Besonders deutlich trat dieser Unterschied in der Wirkung von Glucose und Alkohol immer dann in Erscheinung, wenn eine weitgehend verarmte Hefe in Anwendung kam, die mit Essigsäure allein eine Induktionszeit von mehr als 5 Stunden zeigte.

Die Erklärung für diesen Unterschied bot sich dar, als der Einfluß von *Milchsäure* auf die Dehydrierung der Essig-



Vergleich der Wirkungen von Alkohol, Glucose und Milchsäure.
Hefe 18 Std. verarmt; Acetat $^{m}/_{40}$.
Zusätze:
I. 2×10^{-3} Mmol Na-Lactat + 2×10^{-3} Mmol Alkohol.
II. 2×10^{-3} Mmol Glucose.
III. 4×10^{-3} Mmol Alkohol.
IV. 4×10^{-3} Mmol Na-Lactat.
V. ohne.
VI. 4×10^{-3} Mmol Na-Lactat (ohne Acetat).

Fig. 5.

säure untersucht wurde. Dabei ergab sich (Fig. 4), daß Milchsäure allein (IV) in der Wirkung auf die Induktionszeit dem Alkohol (III) deutlich *unterlegen* ist; eine Mischung von äquivalenten Mengen Alkohol und Milchsäure (I) aber stellt die Wirksamkeit der Hefe gegen Acetat in kürzerer Zeit wieder her als Alkohol allein, und ist etwa ebenso wirksam, manchmal sogar noch wirksamer als die entsprechende Menge Glucose (II, vgl. auch Fig. 5).

Man wird nicht fehl gehen, wenn man die Überlegenheit von Glucose und der Kombination Milchsäure-Alkohol gegenüber Alkohol allein auf die Bildung von *Brenztraubensäure* zurückführt, die aus dem Zucker über die bekannten Zwischen-

produkte der Gärung, aus Milchsäure durch direkte Dehydrierung entsteht. Das Experiment steht mit dieser Annahme in bester Übereinstimmung. Wie aus Fig. 6 zu entnehmen ist,

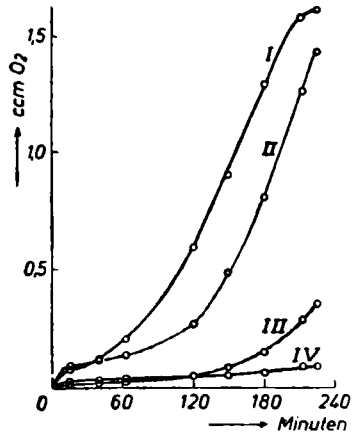


Fig. 6.

Vergleich der Wirkungen von Alkohol und Brenztraubensäure.
Hefe 19 Std. verarmt; Acetat $^{m}/_{60}$.
Zusätze:
I. 2×10^{-3} Mmol Pyruvat + 2×10^{-3} Mmol Alkohol.
II. 4×10^{-3} Mmol Alkohol.
III. 4×10^{-3} Mmol Pyruvat.
IV. ohne.

rufen Brenztraubensäure allein (III) und eine Mischung von Brenztraubensäure und Alkohol (I) dieselben Effekte hervor,

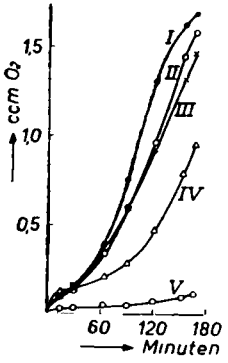


Fig. 7.

Vergleich der Wirkungen von Alkohol, Glucose, Milchsäure und Brenztraubensäure.
Hefe 20 Std. verarmt; Acetat $^{m}/_{60}$.
Zusätze:
I. 2×10^{-3} Mmol Glucose.
II. 2×10^{-3} Mmol Pyruvat + 2×10^{-3} Mmol Alkohol.
III. 2×10^{-3} Mmol Na-Lactat + 2×10^{-3} Mmol Alkohol.
IV. 4×10^{-3} Mmol Alkohol.
V. ohne.

wie Milchsäure und die entsprechende Mischung in den schon besprochenen Versuchen. Auch hier tritt uns wieder die Tatsache entgegen, daß Brenztraubensäure allein nur eine

schwache Wirkung auf die Induktionszeit ausübt, die erst in der Mischung mit Alkohol kräftig wird.

Fig. 7 gibt zuletzt einen Versuch wieder, bei welchem die Wirkungen von Glucose (I), Milchsäure-Alkohol (III), Brenztraubensäure-Alkohol (II) und Alkohol allein (IV) miteinander verglichen werden. In den Ansätzen, die Brenztraubensäure selbst, oder ihre Vorstufen enthalten, ist die maximale Atmung nach 1 Stunde erreicht, während im Versuch mit Alkohol allein dies erst nach 2 Stunden der Fall ist.

Sucht man nach einer Deutung für diese spezifische Wirkung der Brenztraubensäure, dann muß man der Beobachtung Rechnung tragen, daß Brenztraubensäure allein, ebenso wie auch Milchsäure allein, wenig wirksam sind, und erst in Gegenwart von Alkohol den Abbau der Essigsäure aktivieren (vgl. Fig. 4 und 6). Eine Erklärung dafür bietet die Annahme, daß unter der Wirkung des Alkohols aus Brenztraubensäure eine Substanz gebildet wird, die beim Abbau der Essigsäure notwendig ist. Es liegt nahe, daß es sich dabei um *Oxalessigsäure* handelt, deren Aufbau aus Brenztraubensäure und Kohlendioxyd nach folgendem Schema

$$CO_2 + CH_3—CO—CO_2H \longrightarrow HO_2C—CH_2—CO—CO_2H$$

von H. G. Wood und C. H. Werkman[1]) an Propionsäurebakterien entdeckt worden ist, und das neuerdings von A. Kleinzeller[2]) auch für Hefe wahrscheinlich gemacht werden konnte.

Es erübrigt sich im Falle der Hefe, das für diese Reaktion notwendige Kohlendioxyd als solches, oder in Form von Bicarbonat zuzusetzen, da ja die Hefe nach den Untersuchungen von H. Wieland und F. Wille[3]) große Mengen Kohlendioxyd gebunden enthält. Da aber die „Carboxylierung" der Brenztraubensäure unter Energieaufnahme vor sich geht, ist die Zugabe von Alkohol notwendig, dessen Abbau diese Energiemenge aufbringt. Im Versuch mit Glucose erübrigt sich die

---

[1]) Bio. J. **30**, 48 (1936); **32**, 1262 (1938); **34**, 7, 129 (1940); vgl. auch: H. A. Krebs, Nature **147**, 560 (1941).

[2]) Bio. J. **35**, 495 (1941).

[3]) A. **503**, 72 (1933).

Zugabe von Alkohol, da er ja durch die Gärung daraus gebildet wird. Welche Stufe beim Abbau des Alkohols die Carboxylierungsenergie liefert, soll später besprochen werden (S. 301). Es sei aber schon vorweggenommen, daß es sich dabei wahrscheinlich um die Dehydrierung des Acetaldehyds zur Essigsäure handelt.

Daß Milchsäure und Brenztraubensäure allein, obwohl ihr Abbau beim Acetaldehyd in die Abbaufolge des Alkohols einmündet, weniger wirksam als die entsprechenden Mischungen mit Alkohol sind, kann vorderhand noch nicht erklärt werden. Möglicherweise hängt die Erscheinung, daß lebende Hefe Brenztraubensäure unter anaeroben Bedingungen überhaupt nicht, oder nur in sehr beschränktem Umfang decarboxylieren kann[1]), ursächlich damit zusammen. Die Annahme, wonach dieses Unvermögen auf die langsame Diffusion der Brenztraubensäure ins Innere der Zelle zurückzuführen ist, kann den aeroben Umsatz der Brenztraubensäure nicht verständlich machen, und wird daher durch eine andere Deutung zu ersetzen sein.

Versuche mit Bernsteinsäure („Sekundäreffekt").

Als nächstes wurde die Wirkung von *Bernsteinsäure* auf die Induktionsperiode untersucht. Diese Säure ist durch enzymatische Reaktionen, die auch in der Hefe anzutreffen sind, mit der Oxalessigsäure verknüpft. Dabei war von vornherein damit zu rechnen, daß im Gegensatz zu den Versuchen mit Alkohol oder Glucose erst bei einer relativ hohen Substratkonzentration ein Effekt zu sehen ist, da ja die Membran der lebenden Hefezelle für Bernsteinsäure nur wenig durchlässig ist[2]). Wie aus Fig. 8 zu ersehen ist, haben dementsprechend $^{m}/_{90}$- (IV) und $^{m}/_{45}$-Succinat (III) gar keinen, oder nur einen geringen Einfluß, und erst bei den höheren Konzentrationen $^{m}/_{18}$ (II) und $^{m}/_{9}$ (I) tritt eine starke Verkürzung der Induktionsperiode in Erscheinung. Aber selbst in dem Ansatz, der $^{m}/_{9}$-Bernsteinsäure-Succinatpuffer (p_H 4,8) enthält, und der, damit sich das Gleichgewicht zwischen dem Innern der Hefe und der Außenflüssigkeit einstellen kann,

[1]) F. Lynen, A. **539**, 15 (1939); J. Runnström u. E. Sperber, Ark. Kem. Mineral. Geol. 15 A, Nr. 5 (1941).

[2]) Vgl. Anm. 4, S. 271.

$1^1/_2$ Stunden in dieser Lösung vorgeschüttelt wurde[1]), wird nach dem Einkippen der Essigsäure nicht sofort die maximale Dehydrierungsgeschwindigkeit beobachtet. Es verstreicht eine Induktionsperiode von etwa 60 Minuten, bis die Hefe ihre volle Wirksamkeit gegen Acetat entfalten kann. Durch Alkohol oder Glucose kann auch hier wieder diese reaktionsarme Zeit-

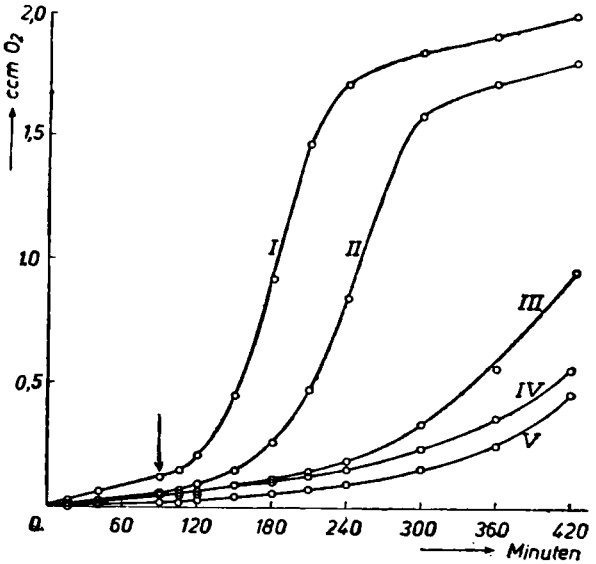


Fig. 8. Wirkung von Bernsteinsäure.

Im Seitengefäß: 1,5 ccm $^m/_{30}$-Na-Acetat, die 90 Minuten nach Versuchsbeginn zugekippt wurden (↓).

Im Hauptraum: 100 mg Hefe ($17^1/_2$ Stunden verarmt), 0,66 m-Bernsteinsäure–Natriumsuccinat, $p_H = 4{,}84$, und zwar in:

I: $^1/_3$ Mmol. II: $^1/_6$ Mmol. III: $^1/_{15}$ Mmol. IV: $^1/_{30}$ Mmol. V: ohne. Gesamtvolumen 3 ccm.

spanne abgekürzt werden (Fig. 9). Dabei ist besonders zu beachten, daß nunmehr der Alkohol (I) ebenso wirksam, wenn nicht sogar etwas wirksamer als der Zucker (II) ist. Dies ist ein direkter Beweis dafür, daß die Überlegenheit der Glucose über

[1]) Die Succinatkonzentration während der Vorbehandlung betrug sogar $^m/_{4.5}$ (vgl. Text zu Fig. 8).

den Alkohol, die in den Versuchen ohne Bernsteinsäure beobachtet wurde (vgl. Fig. 3 und 7), nur darauf zurückzuführen ist, daß aus dem Zucker Brenztraubensäure und weiterhin Oxalessigsäure entsteht. In Gegenwart von Bernsteinsäure wird die Oxalessigsäure durch direkte Dehydrierung über die Zwischenglieder *Fumarsäure* und *Äpfelsäure* gebildet, so daß die zusätzlich aus Glucose entstehende Oxalessigsäure nicht mehr ins Gewicht fällt.

Die bisherigen Versuche machen also klar, daß zum Abbau der Essigsäure in der Hefe *Oxalessigsäure* unbedingt notwendig

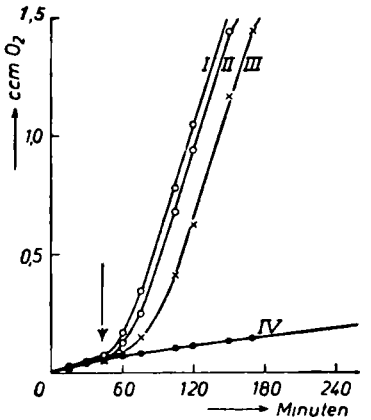


Fig. 9.

Alkohol und Glucose in Gegenwart von Bernsteinsäure.
Hauptraum: 100 mg Hefe (16 Stdn. verarmt) + 0,5 ccm 0,66 m-Bernsteinsäure-Succinat, $P_H = 4{,}84$, mit H_2O auf 1,5 ccm.
Seitengefäß (mit H_2O auf 1,5 ccm):
I. 5×10^{-2} Mmol Na-Acetat + 2×10^{-3} Mmol Alkohol.
II. 5×10^{-2} Mmol Na-Acetat + 10^{-3} Mmol Glucose.
III. 5×10^{-2} Mmol Na-Acetat.
IV. ohne.
45 Min. nach Versuchsbeginn (↓) Inhalt der Seitengefäße zugekippt.

ist, daß aber damit allein die Dehydrierung des Acetats noch nicht in Schwung kommt. Erst wenn kleine Mengen Alkohol oder Zucker oxydiert werden, kann die Hefe ihre volle Wirksamkeit gegenüber Essigsäure entfalten. Den Beleg dafür, daß diese Wirkung von Alkohol oder Zucker nicht etwa darauf zurückzuführen ist, daß die Hefe unter den angewandten Versuchsbedingungen ihr enzymatisches System mit der zugefügten Bernsteinsäure nicht sättigen konnte, und daher nur auf Oxalessigsäure anspricht, die beim Abbau des Alkohols oder der Glucose gebildet wird, bringt Fig. 10. In diesen Versuchen wurde die Hefe einmal 10 Minuten, das andere Mal 250 Minuten lang in $^{m}/_{4,5}$-Bernsteinsäure-Succinatpuffer unter Sauerstoff

geschüttelt, bevor das Acetat (I, I'), bzw. das Acetat und eine Spur Glucose (II, II') eingekippt wurden. Obwohl die Hefe in den zweiten Ansätzen sehr viel mehr Zeit gehabt hat, um sich mit der Suspensionslösung ins Gleichgewicht zu setzen, waren nach dem Einkippen der Substrate dieselben Veränderungen wahrzunehmen wie bei den nur 10 Minuten vorbehandelten Proben. Essigsäure allein zeigt in beiden Fällen eine Induktionsperiode von etwa 90 Minuten,

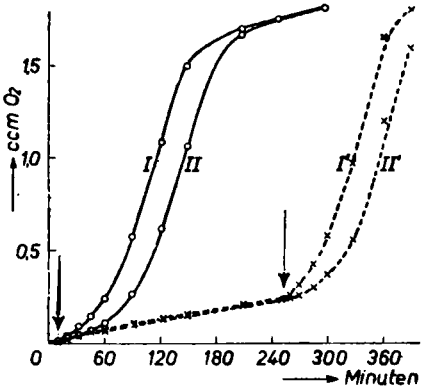


Fig. 10. Glucose in Gegenwart von Bernsteinsäure.

Hauptraum: 100 mg Hefe (21 Stunden veratmt) + 0,5 ccm 0,66 m-Bernsteinsäure-Succinatpuffer, $p_H = 4{,}84$, mit H_2O auf 1,5 ccm.

Seitengefäß: I, I': 5×10^{-2} Mmol Na-Acetat + 2×10^{-3} Mmol Glucose.
II, II': 5×10^{-2} „ „ .
In I und II 10 Minuten nach Versuchsbeginn (↓),
in I' „ II' 250 „ „ „ (↓) den Inhalt der Seitengefäße zugekippt.

die durch 360 γ Glucose um mehr als ein Drittel abgekürzt wird. Dies beweist wohl zur Genüge, daß eine kurze Vorbehandlung in der konz. Succinat-Bernsteinsäure-Pufferlösung genügt, um das dehydrierende System der Hefe mit Oxalessigsäure zu sättigen. Dem Zucker muß daher eine andere, spezifische Wirkung zukommen.

In Fig. 11 ist ein Versuch wiedergegeben, bei welchem die Wirkung von Alkohol und Glucose in Phosphatpuffer mit der in Bernsteinsäure-Succinatpuffer verglichen wurde. Dabei kam

mit Absicht eine niedrigere Pufferkonzentration als in den vorhergehenden Versuchen in Anwendung. Trotzdem wird die Hefe dabei genügend mit Oxalessigsäure versorgt, so daß Glucose (II) und Alkohol (I) gleich wirksam sind, während in der phosphatgepufferten Lösung die Glucose (II') dem Alkohol (I') deutlich überlegen ist. Wenn aber eine Vorbehandlung in der verdünnten Succinatlösung genügt, um das

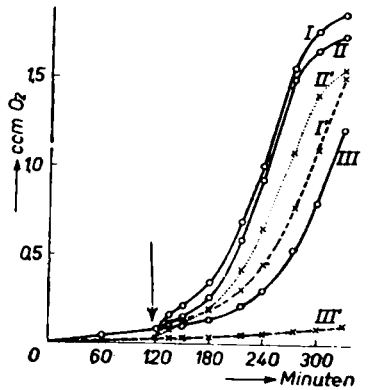


Fig. 11. Vergleich der Wirkungen von Alkohol und Glucose in Phosphatpuffer und in Bernsteinsäurepuffer.

Hauptraum: 100 mg Hefe ($19^1/_2$ Stdn. verarmt) + 0,5 ccm 0,33 m-Bernsteinsäure–Succinat, $p_H = 4{,}84$ (I, II, III)
bzw. 0,5 ccm $^m/_5$-KH_2PO_4-Lösung (I', II', III') mit H_2O auf 1,5 ccm.

Seitengefäß:

I, I': 5×10^{-2} Mmol Na-Acetat + 4×10^{-3} Mmol Alkohol
II, II': 5×10^{-2} „ „ + 2×10^{-3} Mmol Glucose
III, III': 5×10^{-2} „ „
} mit H_2O auf 1,5 ccm.

120 Min. nach Versuchsbeginn (↓) Inhalt der Seitengefäße zugekippt.

Fermentsystem der Hefe mit Oxalessigsäure zu sättigen, — so daß die aus Glucose gebildete Oxalessigsäure nunmehr ohne Wirkung ist —, wieviel eher muß dies dann in der konz. Lösung der Fall sein? Wir kommen also auch auf Grund dieses Versuches zu der Schlußfolgerung, daß Alkohol und Glucose auch noch in anderer Beziehung bei der Einleitung des Acetatabbaus von Bedeutung sein müssen.

Um dieser Wirkung des Alkohols oder der Glucose, — die ich vorderhand, um sie von der Bildung von Oxalessigsäure, dem „*Primäreffekt*", abzugrenzen, den „*Sekundäreffekt*" nennen möchte —, näherzukommen, wurde eine Reihe von Substanzen in Gegenwart von Bernsteinsäure auf ihre Eignung als Aktivatoren des Acetatabbaus untersucht (Fig. 12). Dabei wurde die Beobachtung gemacht, daß nicht nur Alkohol (IV) und Glucose (III), sondern auch Brenztraubensäure (V) und, was

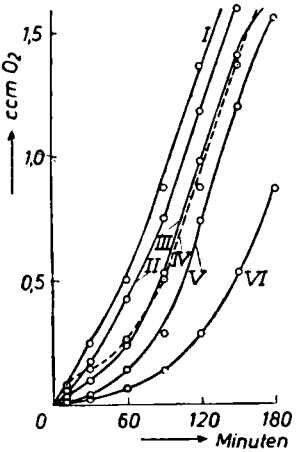


Fig. 12.

Wirkung verschiedener Zusätze in Gegenwart von Bernsteinsäure.

Hauptraum: Hefe 17 Std. verarmt, in 1,5 ccm $^m/_9$-Bernsteinsäure-Succinat. Die Hefe war $1^1/_4$ Stunden in diesem Puffer unter Luft vorgeschüttelt worden, bevor die Substrate (zur Zeit 0 der Figur) aus dem Seitengefäß zugekippt wurden.

Seitengefäß: 5×10^{-2} Mmol Na-Acetat mit Zusätzen auf 1,5 ccm, und zwar

I.	8×10^{-3} Mmol	Propanol.
II.	8×10^{-3} „	Butanol.
III.	2×10^{-3} „	Glucose.
IV.	4×10^{-3} „	Alkohol.
V.	4×10^{-3} „	Pyruvat.
VI.	ohne.	

uns den Schlüssel zum Verständnis des „Sekundäreffekts" in die Hand gibt, auch *Propyl-* und *Butylalkohol* (I, II) die Induktionsperiode abkürzen.

Während Äthylalkohol von der Hefe vollständig verbrannt wird, führt die Dehydrierung der Homologen mit 3 bzw. 4 C-Atomen nur bis zu den entsprechenden Säuren. Den Beweis liefert Fig. 13, die einen Atmungsversuch mit Äthyl-, Propyl- und Butylalkohol wiedergibt. Während pro Mol Äthanol mehr als 2 Mole Sauerstoff verschwinden, was auf eine weitgehende Verbrennung des Alkohols schließen läßt, macht die Sauerstoffaufnahme bei Propanol und Butanol nach Verbrauch von 1 Mol Sauerstoff halt, wie man dies beim Übergang in die Säure erwarten muß.

Es sei darauf hingewiesen, daß Propylalkohol mit etwa derselben Geschwindigkeit wie Äthylalkohol, Butylalkohol dagegen nur mit halber Geschwindigkeit durch Sauerstoff dehydriert werden.

Nachdem also Propyl- und Butylalkohol den „Sekundäreffekt" hervorrufen können, ihr Abbau in der Hefe aber nur bis zu den entsprechenden Säuren führt, darf man annehmen, daß auch beim Äthylalkohol dieser Effekt mit der Oxydation zur Essigsäure zusammenhängt. Diese Dehydrierung erfolgt in zwei Stufen, in der ersten zum Aldehyd und in der zweiten zur Säure, so daß noch zu entscheiden ist, welche der beiden

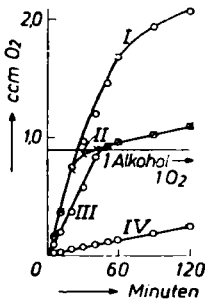


Fig. 13.

Atmung der verarmten Hefe mit Äthanol, Propanol und Butanol.

Je 200 mg Hefe (7 Stunden verarmt) + 0,3 ccm 0,66 m-Phosphatpuffer, $p_H = 6{,}8$, mit Zusätzen auf 3 ccm Gesamt-Volumen.

I: $^m/_{75}$-Äthylalkohol.
II: $^m/_{75}$-Propylalkohol.
III: $^m/_{75}$-Butylalkohol.
IV: ohne.

Stufen die wirksame ist. Die Tatsache, daß auch Brenztraubensäure, die in der Hefe zu Acetaldehyd decarboxyliert, und von dort weiter zu Essigsäure dehydriert wird, den „Sekundäreffekt" zeigt, macht es sehr wahrscheinlich, daß die Reaktion

$$\text{Aldehyd} \xrightarrow{-2H} \text{Säure}$$

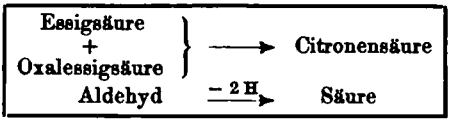
den wirksamen Schritt darstellt. Äthylalkohol, Glucose und Brenztraubensäure haben bei der Oxydation zur Essigsäure nur mehr die Dehydrierung des Acetaldehyds gemeinsam.

Der Abbauweg der Essigsäure.

Bevor ich zu den weiteren Versuchen übergehe, soll ein Reaktionsmechanismus für den Angriff der Hefe auf das Acetat in Vorschlag gebracht werden, der dem bisherigen Versuchsmaterial Rechnung trägt. Dem Beweis dieser Vorstellung und ihrem Ausbau sollen dann die folgenden Experimente dienen.

Die Tatsache, daß zum Abbau der Essigsäure *Oxalessigsäure* notwendig ist, kann wohl als Beweis dafür angesehen werden, daß der erste Angriff auf die Essigsäure in einer Kondensation mit Oxalessigsäure zu *Citronensäure* besteht, wie dies schon in einer vorhergehenden Arbeit[1]) angenommen wurde. Daß eine derartige Reaktion in der Hefe möglich ist, wird durch die Experimente von H. Wieland und R. Sonderhoff[2]), vor allem aber auch durch die ausgezeichnete Untersuchung von R. Sonderhoff und H. Thomas[3]) mit deuteriumhaltiger Essigsäure hinreichend bewiesen.

Das Besondere an dieser Reaktion ist aber, und dies scheint mir die Ursache des „Sekundäreffekts" zu sein, daß diese Kondensation in der Hefe nur dann zustande kommt, wenn *gleichzeitig ein Aldehyd zur Säure dehydriert wird.* Die allgemeinste Formulierung des ersten Angriffs der Hefe auf die Essigsäure ist demnach folgende:



Dabei soll die Umrahmung bedeuten, daß beide Vorgänge in irgendeiner Weise miteinander gekoppelt sind.

Damit Essigsäure von der Hefe abgebaut werden kann, müssen also zwei Voraussetzungen erfüllt sein. Zum ersten muß Oxalessigsäure vorhanden sein, und zum zweiten muß ein Aldehyd zur Säure dehydriert werden. Die Wirkung einer Substanz auf die Induktionszeit ist demnach unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten zu betrachten: 1. wie trägt der Stoff zur Bildung von Oxalessigsäure bei, und 2. in welcher Weise ermöglicht er die Kondensation von Essigsäure mit Oxalessigsäure?

Bezüglich der Wirkung des Alkohols erhebt sich hier zunächst die Frage, wie in seiner Gegenwart die Synthese der Oxalessigsäure zustande kommt. Von vornherein war damit zu rechnen, daß aus dem Alkohol bei der Dehydrierung eine

[1]) F. Lynen u. N. Neciullah, A. 541, 215 (1939).
[2]) A. 499, 213 (1932). [3]) A. 580, 195 (1937).

Essigsäure „in statu nascendi" nach H. Wieland[1]) entsteht, aus der dann durch paarweise Dehydrierung Bernsteinsäure und weiterhin Oxalessigsäure gebildet werden.

Die vergleichenden Versuche mit Äthyl-, Propyl- und Butylalkohol sprechen aber gegen diese Annahme (Fig. 14).

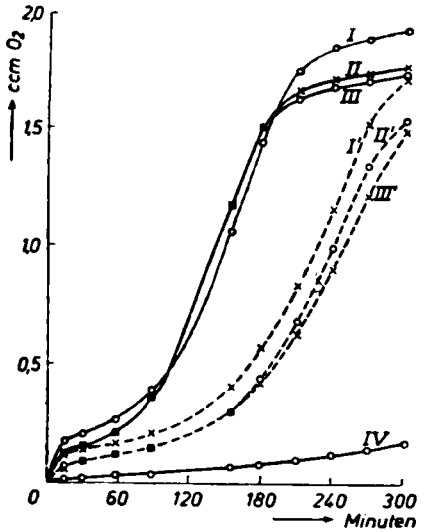


Fig. 14. Wirkung von Äthanol, Propanol und Butanol.

Hefe, 16 Stunden verarmt + 0,5 ccm $^m/_5$-KH_2PO_4-Lösung + 0,1 ccm $^m/_2$-Na-Acetat mit Zusätzen auf 3 ccm Gesamt-Volumen.

I u. I': 8×10^{-3} und 4×10^{-3} Mmol Äthylalkohol.
II u. II': 8×10^{-3} „ 4×10^{-3} „ Propylalkohol.
III u. III': 8×10^{-3} „ 4×10^{-3} „ norm. Butylalkohol.
IV: ohne.

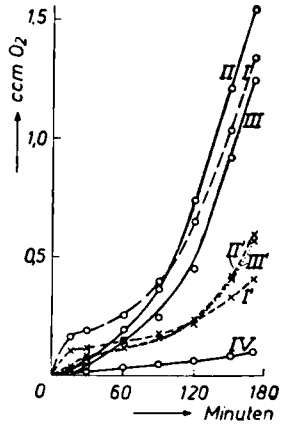
Es ist ja ohne weiteres einzusehen, daß nur aus einer *Essigsäure* „in statu nascendi" Oxalessigsäure entstehen kann, nicht aber aus einer angeregten *Propionsäure* oder *Buttersäure*. Wenn die Oxalessigsäure in der Hefe also dieser Reaktion ihre Entstehung verdankt, dann müßte Äthylalkohol die Aktivität der verarmten Hefe gegen Acetat schneller wiederherstellen als

[1]) Helv. chim. Acta **15**, 521 (1932).

die homologen Alkohole. Die Figur zeigt aber, daß die verschiedenen Alkohole bei gleicher Konzentration die Induktionszeit in genau derselben Weise beeinflussen. Die Oxalessigsäure muß daher in diesen Versuchen einer anderen Reaktion ihre Entstehung verdanken, einer Reaktion, bei der die verschiedenen Alkohole einander qualitativ und quantitativ vollständig ersetzen können. Diese Bedingung ist erfüllt, wenn auch hier die Carboxylierung von Brenztraubensäure, die aus den Inhaltsstoffen der Hefe stammt, die Oxalessigsäure liefert. Die Versuche von H. Wieland und F. Wille[1]) an verarmter Bierhefe haben ergeben, daß die geringe Sauerstoffzehrung, die eine solche Hefe noch zeigt, zu einem großen Teil zur Oxydation von Kohlehydraten dient, und neuere Versuche von T. J. B. Stier und J. N. Stannard[2]), wie auch von H. Borei[3]) an verarmter Bäckerhefe hatten dasselbe Ergebnis. Nachdem beim Abbau des Kohlehydrats die Stufe der Brenztraubensäure durchschritten wird, bedeutet dies aber, daß in der verarmten Hefe, — wenn auch der geringen Atmung entsprechend nur in geringem Umfang, — dauernd Brenztraubensäure gebildet, und auch wieder abgebaut wird. Wird der Hefe Alkohol dargeboten, dann kann ein Teil der bei seiner Oxydation freiwerdenden Energie zur Carboxylierung dieser Brenztraubensäure herangezogen werden (vgl. S. 278). Die Tatsache, daß Propyl- und Butylalkohol dieselbe Wirksamkeit wie Äthylalkohol besitzen, weist darauf hin, daß auch hier der entscheidende Vorgang beim Übergang des Alkohols in die Säure zu suchen ist. Aus den Versuchen von Fig. 6 und 7 (S. 277), wonach Zugabe von Brenztraubensäure in Gegenwart von Alkohol eine zusätzliche Verkürzung der Induktionsperiode mit sich bringt, darf man die Schlußfolgerung ziehen, daß bei Zusatz von Alkohol allein die bei der Leeratmung der verarmten Hefe gebildete Brenztraubensäure die aktivierende Wirkung des Alkohols tatsächlich begrenzt. Erst wenn Oxalessigsäure vorhanden ist, kann der „Sekundäreffekt" des Alkohols zur Geltung kommen.

[1]) A. **515**, 262 (1935).
[2]) J. Gen. Physiol. **19**, 461, 479 (1936).
[3]) Naturw. **30**, 260 (1942); Bio. Z. **312**, 160 (1942).

Nun sind wir auch in der Lage, für die eigenartige Form der Atmungskurven, die in den Versuchen mit Alkohol (Fig. 14 und Fig. 1) zu sehen sind, eine Erklärung zu geben. Für den Abbau der Essigsäure ist Oxalessigsäure notwendig. Dabei ist es gleichgültig, ob die Essigsäure als solche zugesetzt wurde, oder aus Alkohol intermediär entsteht. Da in den Versuchen mit Alkohol allein die Bildungsgeschwindigkeit der Oxalessigsäure den begrenzenden Faktor darstellt, d. h. weniger Oxalessigsäure vorhanden als zur Sättigung des dehydrierenden Systems nötig ist, kann nur ein kleiner Teil der intermediär entstandenen Essigsäure weiter abgebaut werden. Die Hauptmenge dieser Essigsäure bleibt wie die zugesetzte Essigsäure zunächst liegen. Nach Zugeben der Substrate tritt daher in der Atmungskurve der erste Knick dann auf, wenn der zugesetzte Alkohol



Wirkung von Äthylalkohol, Acetaldehyd u. Propionaldehyd.
Hefe 16 Stunden verarmt + 0,5 ccm $^m/_5$-KH_2PO_4 + 0,1 ccm $^m/_2$-Na-Acetat mit Zusätzen auf 3 ccm Ges.-Vol.
I u. I': 8×10^{-3} und 4×10^{-3} Mmol Äthylalkohol.
II u. II': 16×10^{-3} und 8×10^{-3} Mmol Acetaldehyd.
III u. III': 16×10^{-3} und 8×10^{-3} Mmol Propionaldehyd.
IV: ohne.

Fig. 15.

zur Essigsäure dehydriert ist. Der theoretische Sauerstoffverbrauch für diese Reaktion berechnet sich für 8×10^{-3} Millimol (= 378 γ) Alkohol zu 179 cmm Sauerstoff, für 4×10^{-3} Millimol (= 184 γ) Alkohol zu 90 cmm Sauerstoff. Die berechneten Werte stimmen mit den beobachteten Werten gut überein (vgl. Figuren).

In Gegenwart von Bernsteinsäure verschwindet dieser Knick vollständig (Fig. 9), oder tritt zumindest sehr viel weniger ausgeprägt in Erscheinung (Fig. 11 und 12), da nunmehr genügend Oxalessigsäure vorhanden ist, und daher der Abbau des Alkohols nicht bei der Essigsäure halt macht. Dasselbe ist auch in Gegenwart von Milchsäure oder Brenztraubensäure der Fall (vgl. die entsprechenden Figuren).

Daß alle diese Wirkungen des Alkohols eigentlich dem *Aldehyd* zukommen, ist aus Fig. 15 zu ersehen, in welcher die

Wirkung des Äthylalkohols mit der von Acetaldehyd und Propionaldehyd verglichen wurde. Wie die Alkohole bringen auch die Aldehyde die reaktionslose Periode beim Essigsäureabbau zum Verschwinden. Allerdings muß man, um die gleiche Wirkung zu erzielen, größere Konzentrationen in Anwendung bringen.

Dies ist aber kein Argument gegen die Annahme, daß auch bei den Alkoholen einzig und allein die durch Dehydrierung daraus entstehenden Aldehyde wirksam sind. Die Aldehyde stellen ja im Gegensatz zu den Alkoholen außerordentlich reaktive Verbindungen dar, die in der angewandten Konzentration in Nebenreaktionen verbraucht werden können[1]), so daß nur ein Teil des zugesetzten Aldehyds in der Hefe auch wirklich zur Säure dehydriert wird. Beim Abbau der Alkohole dagegen treten die Aldehyde nur in minimalen Konzentrationen in Erscheinung[2]). Für die Richtigkeit dieser Annahme scheint zu sprechen, daß in Fig. 15 bei der höheren Konzentration (I—III) die Aldehyde nur etwa halb so wirksam sind wie der Alkohol, während bei der kleineren Konzentration (I'—III') dieses Verhältnis zugunsten der Aldehyde verschoben ist.

Die Versuche mit Milch- und Brenztraubensäure, die weiter unten (S. 303) besprochen werden, machen es auch sehr wahrscheinlich, daß nur die Dehydrierung des Aldehyds zur Säure wirksam ist.

Die Wirkung des Aldehyds besteht darin, daß bei seiner Dehydrierung gleichzeitig Essigsäure und Oxalessigsäure zu Citronensäure kondensiert werden. Die Dehydrierung des Aldehyds und die Synthese der Citronensäure sind demnach irgendwie energetisch gekoppelt. Da den bis jetzt in ihrem Mechanismus aufgeklärten Energieübertragungen in der Zelle ausnahmslos ein stofflicher Mechanismus zugrunde liegt[3]), darf man erwarten, daß auch diese Koppelung über stöchiometrische chemische Reaktionen erfolgt. Man muß daher annehmen, daß als Folge der Dehydrierung eines Aldehyds einer der beiden,

---

[1]) Z. B. Reaktionen mit Aminogruppen des Hefeeiweißes.

[2]) Die Messungen von H. v. Euler, Adler u. Hellström [H. **241**, 239 (1936)], sowie E. Negelein u. Wulff [Bio. Z. **293**, 351 (1937)] an der Alkoholdehydrase der Hefe haben ergeben, daß das Gleichgewicht der Wasserstoffverschiebung: Alkohol + Codehydrase $\rightleftharpoons$ Aldehyd + Dihydrocodehydrase, ganz auf der Seite des Alkohols liegt. Die Alkohole können also in der Zelle nur mit der Geschwindigkeit dehydriert werden, mit der die Aldehyde weiter umgesetzt werden.

[3]) F. Lynen, Naturw. **30**, 398 (1942).

oder möglicherweise auch beide Kondensationspartner eine stoffliche Veränderung erfahren, und daß erst diese abgewandelten Essigsäure- oder Oxalessigsäuremolekeln, die ich ganz allgemein als „aktiviert" bezeichnen möchte, die Kondensation zu Citronensäure, bzw. einer Vorstufe der Citronensäure eingehen.

Berücksichtigt man nur die Wirkung des Äthylalkohols oder des Acetaldehyds, dann ist die Annahme naheliegend, daß bei ihrer Dehydrierung eine „aktivierte" Essigsäure entsteht, die dann mit normaler Oxalessigsäure reagiert. Nachdem aber Propyl- und Butylalkohol qualitativ und quantitativ dieselbe Wirkung wie der Äthylalkohol besitzen, muß man auch mit der Möglichkeit rechnen, daß die Oxalessigsäure in eine „aktivierte" Form übergeführt wird.

Betrachtungen über die Art dieser Veränderungen anzustellen, erscheint mir im Hinblick auf die Tatsache, daß der Dehydrierungsmechanismus des Acetaldehyds und seiner Homologen noch völlig unbekannt ist, verfrüht. Da auch hier die *Phosphorsäure* eine wichtige Rolle spielt[1,2]), ist es vielleicht möglich, daß phosphorylierte Produkte dabei im Spiele sind.

Von größter Bedeutung ist die Beobachtung, daß Propion- und Butyraldehyd dieselbe Wirkung wie der Acetaldehyd haben, daß also ganz allgemein jeder Aldehyd, der von der Hefe dehydriert wird, die Kondensation von Essigsäure mit Oxalessigsäure auslösen kann. Diese Tatsache erklärt nämlich, warum die Essigsäure, die ja nach der eben entwickelten Vorstellung gewissermaßen nur „im Feuer eines Aldehyds" angegriffen werden kann, von der verarmten Hefe überhaupt verbrannt wird. Dazu müssen wir die Reaktionsfolge besprechen, die sich beim Abbau der Essigsäure an die Bildung der Citronensäure anschließt. In einer vorhergehenden Arbeit[3]) konnten wir zeigen, daß die Citronensäure in der Hefe nach C. Martius[4]) abgebaut wird, d. h. über *cis*-Aconitsäure und Isocitronensäure schließlich durch Dehydrierung in α-Keto-

[1]) Vgl. Anm. 3, S. 290.
[2]) F. Lynen, A. **546**, 120 (1941).
[3]) F. Lynen u. N. Neciullah, A. **541**, 203 (1939).
[4]) H. **247**, 104 (1937); **257**, 29 (1939).

glutarsäure übergeht[1]). Über den weiteren Abbau dieser α-Ketosäure sind wir durch die Untersuchungen von C. Neuberg und M. Ringer[2]), wie auch durch eigene Experimente[3]) unterrichtet. Die α-Ketoglutarsäure wird zunächst decarboxyliert, und der dabei entstehende *Bernsteinsäurehalbaldehyd* (= β-Aldehydopropionsäure) zu Bernsteinsäure dehydriert. Beim Abbau der Essigsäure entsteht also ein Aldehyd, dessen Dehydrierung die Kondensation einer neuen Essigsäuremolekel mit Oxalessigsäure ermöglicht. Die Oxalessigsäure entstammt nunmehr der aus dem Bernsteinsäurehalbaldehyd gebildeten Bernsteinsäure, aus der sie in der bekannten Reaktionsfolge über Fumarsäure und Äpfelsäure entsteht.

---

[1]) In dieser Untersuchung, die mit gefrorener Hefe ohne Zugabe besonderer Hemmstoffe ausgeführt wurde, konnte beim Abbau der Citronensäure die α-Ketoglutarsäure selbst nicht direkt nachgewiesen werden, sondern nur ihr Dehydrierungsprodukt, die Bernsteinsäure. Es gelingt aber die α-Ketoglutarsäure abzufangen, wenn man den Versuchslösungen $^{m}/_{200}$-arsenige Säure zusetzt [vgl. H. A. Krebs, H. 218, 157 (1933)]. Im folgenden ist das Protokoll eines derartigen Versuches wiedergegeben; die Bereitung der gefrorenen Hefe und des Kochsaftes ist in der zitierten Arbeit (S. 205 bzw. 207) beschrieben.

5 g gefrorene Hefe, in 5 ccm Kochsaft suspendiert, wurden nach Zugabe von 510 mg festem Na-citrat und 0,5 ccm $^{m}/_{10}$-Arsenitlösung 1 Stunde lang bei 30° unter Sauerstoff geschüttelt. Am Ende des Versuchs 10 ccm 20-proc. Trichloressigsäurelösung zugesetzt und mit Wasser auf 50 ccm verdünnt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert, und 10 ccm der klaren Lösung mit 1,5 ccm einer heißen Dinitrophenylhydrazin-HCl-lösung (200 mg 1,4-Dinitrophenylhydrazin + 20 ccm 2 n-HCl) versetzt. Nach 24-stündigem Aufbewahren im Eisschrank wurde der ausgefallene Niederschlag abzentrifugiert und getrocknet. Ausbeute: 23,3 mg.

Das gelbe Dinitrophenylhydrazon war bis auf einen verschwindend kleinen Rest in Natriumbicarbonatlösung löslich, und zeigte nach einmaligem Umkrystallisieren aus verdünnter Salzsäure den Schmelzp. 218°. Mischschmelzpunkt mit dem 1,4-Dinitrophenylhydrazon der α-Ketoglutarsäure: 218°.

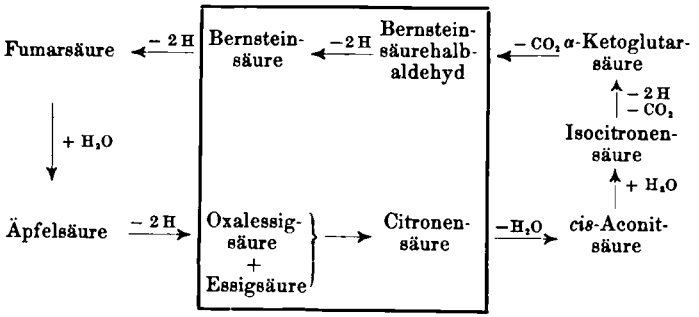
Auf die Gesamtmenge umgerechnet entspricht das isolierte Hydrazon: 52 mg α-Ketoglutarsäure = 0,357 Millimol.

In einem Parallelversuch ohne Citronensäure wurde kein Dinitrophenylhydrazon erhalten.

[2]) Bio. Z. **71**, 226, 237 (1915); **91**, 131 (1918).

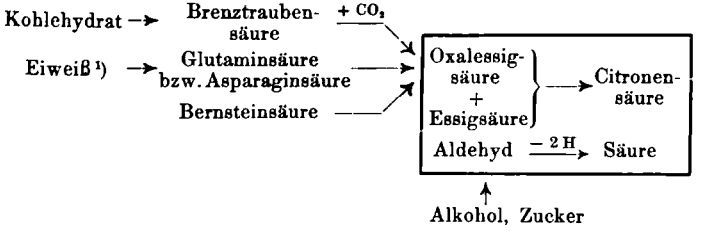
[3]) Vgl. Anm. 3, S. 291.

Dieser Kreisprozeß hat also zum Ergebnis, daß für jede Molekel Essigsäure, die dabei zu Kohlendioxyd und Wasser oxydiert wird, eine neue Molekel Essigsäure in den Kreislauf eintritt, daß also die Essigsäure gewissermaßen in „ihrem eigenen Feuer" verbrennt. Das folgende Schema gibt diesen Kreisprozeß im stationären Zustand wieder, wobei die Umrahmung wiederum auf die gekoppelten Reaktionen hinweisen soll.



Der „Sekundäreffekt" der Alkohole, der Aldehyde und des Zuckers besteht nun einfach darin, daß ihre Oxydation diesen Kreisprozeß auslösen kann. Es ist daher nicht weiter verwunderlich, daß schon sehr geringe Substanzmengen diesen Effekt zeigen.

Die einleitende Reaktion lautet dann:



wobei im Falle der Alkohole und des Zuckers der Aldehyd erst durch andere Reaktionen gebildet werden muß. Ist aber

¹) Vgl. S. 296.

einmal Citronensäure entstanden, dann sorgt ihr Abbau über α-Ketoglutarsäure und Bernsteinsäurehalbaldehyd dafür, daß bis zum vollständigen Verbrauch der zugesetzten Essigsäure immer wieder von neuem Citronensäure gebildet wird.

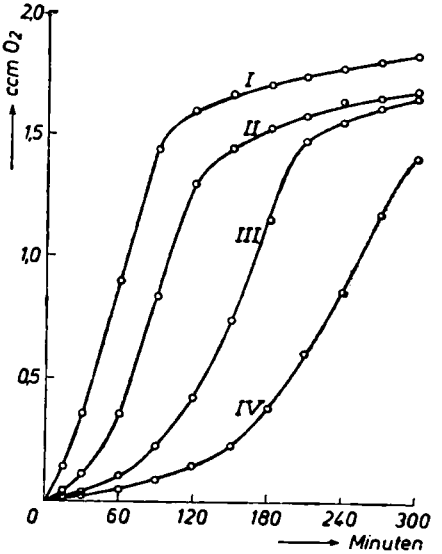


Fig. 16. Vergleich der Wirkungen von Bernsteinsäurehalbaldehyd und Bernsteinsäure.

Hauptraum: Je 100 mg Hefe (18 Stunden verarmt) + 0,5 ccm $^{m}/_{6}$-KH_2PO_4-Lösung mit Zusätzen auf 2 ccm.

I: 5×10^{-2} Mmol Bernsteinsäurehalbaldehyd.
II: 2×10^{-2} Mmol „
III: 2×10^{-2} Mmol Bernsteinsäure. IV: ohne.

Seitengefäß: 1,0 ccm $^{m}/_{20}$-Na-Acetat.

20 Minuten (Zeit 0 in der Figur) nach Einpipettieren der Hefe Manometerhähne geschlossen und den Inhalt der Seitengefäße zugekippt.

Es ist leider nicht möglich, diese Wirkung der Citronensäure an der lebenden Hefe experimentell nachzuweisen, da die Hefemembran für Citronensäure nahezu vollständig undurchlässig ist[1]). Dagegen ist es möglich, den Wert dieser Vorstellung

[1]) Vgl. Anm. 3, S. 291.

durch Versuche mit *Bernsteinsäurehalbaldehyd*[1]), der Schlüsselsubstanz dieses ganzen Kreisprozesses zu prüfen. Fig. 16 gibt einen derartigen Versuch wieder. In einer Lösung, die $^m/_{60}$-Bernsteinsäurehalbaldehyd (I) enthält, setzt die Oxydation der Essigsäure sofort mit maximaler Geschwindigkeit ein, und auch in einer fast 3-mal verdünnteren Lösung ($^m/_{150}$, II) wird die Induktionszeit, die ohne Zusatz 3—4 Stunden dauert, auf 1 Stunde verkürzt. Daß die Wirkung des Bernsteinsäurehalbaldehyds auf die Aldehydgruppe zurückzuführen ist, und nicht

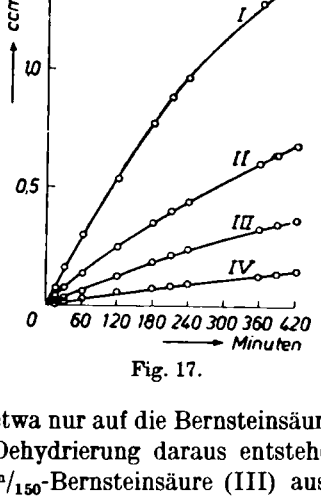


Fig. 17.

Atmung der verarmten Hefe mit Bernsteinsäurehalbaldehyd. I: $^m/_{40}$- II: $^m/_{100}$- III: $^m/_{200}$-Bernsteinsäurehalbaldehyd. IV: ohne Zusatz.

etwa nur auf die Bernsteinsäure, bzw. Oxalessigsäure, die durch Dehydrierung daraus entstehen, wird durch den Ansatz mit $^m/_{150}$-Bernsteinsäure (III) aus Fig. 16 bewiesen. Bei gleicher Konzentration ist der Halbaldehyd der Säure bei weitem überlegen.

Gegenüber Alkohol oder Glucose besteht aber der Unterschied, daß Bernsteinsäurehalbaldehyd in verhältnismäßig hoher Konzentration zugesetzt werden muß, damit ein Effekt zu sehen ist. Dieser Unterschied ist durch die Kinetik der enzymatischen Oxydation bedingt. Im Gegensatz zur Dehy-

[1]) Der Bernsteinsäurehalbaldehyd wurde von Herrn cand. chem. E. Fischer nach der Vorschrift von E. Carrière, A. ch. [9] 17, 70 (1922) bereitet.

drierung von Zucker, Alkohol und Essigsäure, bei denen es sich bis zu sehr kleinen Substratkonzentrationen durchweg um „Reaktionen nullter Ordnung" handelt[1]), ist die Oxydationsgeschwindigkeit von Bernsteinsäurehalbaldehyd, wie Fig. 17 zeigt, sehr stark konzentrationsabhängig. Ob diese Besonderheit darauf zurückzuführen ist, daß die Diffusion des Bernsteinsäurehalbaldehyds in das Innere der Hefe, ein in seiner Geschwindigkeit sicher konzentrationsabhängiger Vorgang, den Umsatz begrenzt, müssen weitere Versuche ergeben.

Tatsächlich genügt es auch im Falle des Bernsteinsäurehalbaldehyds, daß eine Spur der Substanz dehydriert wird, damit der Abbau der Essigsäure in Gang kommt. Die verhältnismäßig hohe Konzentration ist nur nötig, damit diese Dehydrierung rasch genug vor sich geht. So ist es auch zu verstehen, daß am Ende des Versuchs (Fig. 16) der größte Teil des zugesetzten Bernsteinsäurehalbaldehyds wiedergefunden wurde. Über diese quantitativen Versuche soll demnächst ausführlich berichtet werden.

Die „Induktionszeit".

Die Induktionszeit beim Abbau der Essigsäure durch verarmte Hefe ist nun darauf zurückzuführen, daß es auf Grund des geringen Stoffumsatzes in einer solchen Hefe einige Zeit dauert, bis aus ihren Reservestoffen genügend Oxalessigsäure („Primäreffekt") und Aldehyde („Sekundäreffekt") gebildet werden. Ob die Oxalessigsäure dabei durch Carboxylierung von Brenztraubensäure, die ihrerseits aus den Kohlehydratreserven stammt, oder beim Abbau der Eiweißstoffe der Hefe gebildet wird, mag dahingestellt bleiben. Im letzteren Falle wäre vor allem an den Abbau von Asparaginsäure oder Glutaminsäure zu denken, deren oxydative Desaminierung entweder direkt, oder über α-Ketoglutarsäure zu Oxalessigsäure führt. Die Oxalessigsäure wird normalerweise abgebaut, wobei sie als β-Ketosäure Kohlendioxyd abspaltet und in Brenztraubensäure übergeht. In Gegenwart von Essigsäure kann sie aber in Citronensäure übergeführt werden. Die Oxalessigsäure wird

[1]) H. Wieland u. R. Sonderhoff, A. **499**, 219 (1932).

also durch die Essigsäure gewissermaßen konserviert, d. h. vor dem Übergang in den C_3-Körper (= Brenztraubensäure) bewahrt, und zwar dadurch, daß sie zum Aufbau eines C_6-körpers (= Citronensäure) herangezogen wird, dessen Abbau über einen C_5-körper (= α-Ketoglutarsäure) dann wieder in die Reihe der C_4-Dicarbonsäuren einmündet. Die Voraussetzung für die Bildung der Citronensäure aus Essigsäure und Oxalessigsäure, die Dehydrierung eines Aldehyds, ist bei der Leeratmung der verarmten Hefe der sogenannten „endogenen Atmung"[1]), gegeben, bei der es sich ja um eine Verbrennung von Kohlehydrat über Acetaldehyd handelt. Die Folge davon ist, daß nach Maßgabe der Oxalessigsäure- bzw. Acetaldehydbildung das dehydrierende System der verarmten Hefe allmählich mit C_4-Dicarbonsäuren aufgefüllt wird, und damit der Abbau der Essigsäure erfolgen kann.

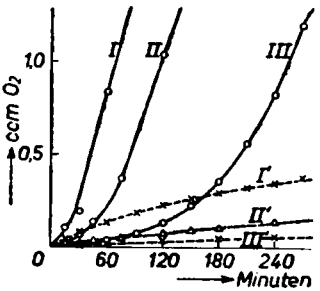
Es ist nun ohne weiteres verständlich, daß die Länge der Induktionsperiode vom Verarmungsgrad der Hefe abhängt. In einer nur kurze Zeit verarmten Hefe, die noch verhältnismäßig viel an Reservestoffen enthält und daher einen entsprechenden Stoffumsatz zeigt, wird die maximale Aktivität gegen Essigsäure schon nach ganz kurzer Zeit erreicht, während eine weitgehend erschöpfte Hefe mehrere Stunden dafür benötigt. Die Länge der Induktionsperiode steht also in direkter Beziehung zur Leeratmung der untersuchten Hefe, wie dies schon von Wieland, Probst und Crawford[2]) beobachtet worden war, und in Fig. 18 noch einmal deutlich vor Augen geführt wird.

Ich muß an dieser Stelle auch noch ein Versäumnis nachholen, das den Versuch mit verschiedenen Mengen Bernsteinsäure betrifft (Fig. 8, S. 280). Es war bei der Besprechung dieses Versuches angenommen worden, daß die Wirkung der Bernsteinsäure einzig und allein darin besteht, die für den Abbau der Essigsäure notwendige Oxalessigsäure zu liefern, d. h. das enzymatische System der Hefe mit C_4-Dicarbonsäuren zu sättigen. In späteren Experimenten (Fig. 11, S. 283) konnte dann nachgewiesen werden, daß dies unter den angewandten Bedingungen bei $^m/_{18}$-Bernsteinsäure der Fall ist. Demnach sollte man also erwarten, daß zwischen den Ansätzen mit $^m/_{18}$- und $^m/_9$-Bernsteinsäure kein Unterschied besteht. Tatsächlich wurde aber beobachtet (Fig. 8), daß die Hefe in der konzentrierteren Succinatlösung etwa 1 Stunde nach Einkippen der Essig-

[1]) Vgl. Anm. 3, S. 288.

[2]) Vgl. Anm. 1, S. 272.

säure die maximale Aktivität erreicht hatte, während in der verdünnteren Lösung die Induktionszeit doppelt so lang war. Die Erklärung für dieses Ergebnis ist, daß in der konz. Lösung der Abbau der Bernsteinsäure bei der Oxalessigsäure nicht halt macht, sondern über Brenztraubensäure, Acetaldehyd. usw. zu einer vollständigen Oxydation der Säure führt[1]). Den Beweis dafür liefert die Atmung der Hefe vor dem Einkippen der Essigsäure, die in $^m/_9$-Bernsteinsäurepuffer etwa doppelt so groß ist als in $^m/_{18}$-Puffer. Die Bernsteinsäure zeigt also in dieser Konzentration außer dem „Primäreffekt", da sie zur Entstehung von Acetaldehyd den Anlaß gibt, auch den „Sekundäreffekt". Daß auf Zugabe von Alkohol oder Glucose in der konz. Succinatlösung trotzdem der „Sekundäreffekt" wahrnehmbar ist (Fig. 9 und 10), muß dem glücklichen Umstand zugeschrieben werden, daß die Decarboxylierung der Oxalessigsäure in



Leeratmung
und Induktionszeit.
I, II, III: $^m/_{60}$-Na-Acetat.
I, I': Hefe $1^1/_2$ Std. lang verarmt.
II, II': „ 7 „ „ „
III, III': „ 24 „ „ „

Fig. 18.

diesen Versuchen einen verhältnismäßig langsamen Vorgang darstellt. Um diese Überlagerung der beiden Effekte nach Möglichkeit auszuschalten, wurde in den späteren Versuchen (ab Fig. 11) bei der niedrigen Succinatkonzentration gearbeitet, oder die Bernsteinsäure ganz weggelassen.

Versuche mit Brenztraubensäure und Milchsäure.

Es war schon bei Besprechung der ersten Versuche mit diesen Säuren, die zur Aufklärung des „Primäreffekts" geführt hatten, auf die merkwürdige Tatsache hingewiesen worden, daß diese Säuren allein, obwohl ihr Abbau zum Acetaldehyd führt, als Aktivatoren des Acetatabbaus nur wenig wirksam

[1]) Es wird hier angenommen, daß in der verdünnteren Succinatlösung die Oxalessigsäure überhaupt nicht, oder nur sehr langsam, auf jeden Fall aber langsamer zu Brenztraubensäure decarboxyliert wird als in $^m/_9$-Succinat. Es ist aber auch möglich, daß die Diffusion der Bernsteinsäure durch die Hefemembran, ein Vorgang, dessen Geschwindigkeit sicher von der Succinatkonzentration abhängt, der begrenzende Faktor ist.

sind, und erst in Kombination mit etwas Alkohol zu einer starken Verkürzung der Induktionszeit führen. Diese Verhältnisse werden durch Fig. 19 noch einmal deutlich vor Augen geführt. In dem zugrunde liegenden Versuch wurden

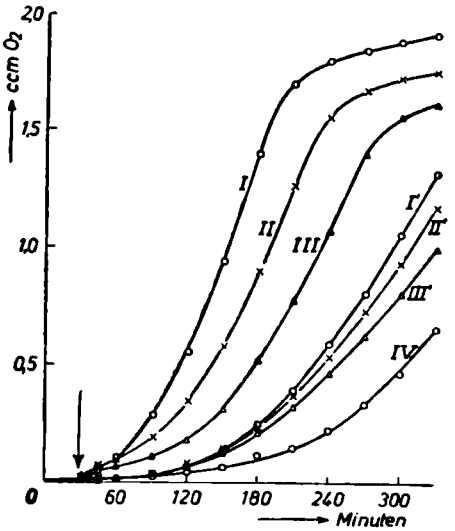


Fig. 19. Wirkung von Brenztraubensäure.

Hauptraum: Je 100 mg Hefe (17 1/2 Stunden verarmt) + 0,5 ccm $^m/_5$-KH_2PO_4-Lösung mit H_2O auf 1,5 ccm.
Seitengefäß: Je 0,1 ccm $^m/_2$-Na-Acetat mit Zusätzen auf 1,5 ccm.
30 Minuten nach Versuchsbeginn (↓) Inhalt der Seitengefäße zugekippt.

I: 8×10^{-3} Mmol Na-Pyruvat
II: 4×10^{-3} „ „
III: 2×10^{-3} „ „
} + 2×10^{-3} Mmol Alkohol.

I': 10×10^{-3} Mmol Pyruvat. III': 4×10^{-3} Mmol Pyruvat.
II': 6×10^{-3} „ „ IV: ohne Zusatz.

der acetathaltigen Hefesuspension verschieden große Mengen *Brenztraubensäure* zugesetzt, und zwar einmal mit Alkohol und einmal ohne Alkohol[1]). Bei den Versuchen ohne Alkohol

[1]) In den Ansätzen ohne Alkohol wurde eine dem Alkoholgehalt des Parallelansatzes äquivalente Menge Brenztraubensäure *mehr* zugesetzt. z. B.: II: 0,5 ccm $^m/_{125}$-Na-pyruvat + 0,25 ccm $^m/_{125}$-Alkohol; II': 0,75 ccm $^m/_{125}$-Na-pyruvat.

(I', II', III') fällt auf, daß in den ersten 2—3 Stunden zwischen den verschiedenen Ansätzen kein Unterschied zu sehen ist, und daß sich erst von der 3. Stunde ab die Pyruvatkonzentration auswirkt. Man hat also auf Grund dieses Versuches den Eindruck, als ob die zugesetzte Brenztraubensäure zunächst unangegriffen liegen bliebe, und erst durch einen Vorgang, der von der vorgelegten Pyruvatmenge unabhängig ist, und womöglich mit der endogenen Atmung der verarmten Hefe zusammenhängt, angreifbar gemacht wird. In der ersten Phase verhalten sich deshalb die Versuche mit den verschiedenen Pyruvatmengen völlig gleichartig. Erst in der zweiten Phase kommt der größeren Pyruvatmenge auch eine stärkere Aktivierung des Acetatabbaus zu, wie man auf Grund der Tatsache, daß bei ihrer Decarboxylierung mehr Acetaldehyd gebildet wird, auch erwarten sollte. Durch 92 γ Alkohol kann die erste Phase zum Verschwinden gebracht werden (I, II und III), so daß sich von vornherein die Menge der zugesetzten Brenztraubensäure auswirkt. Wie Fig. 20 zeigt, kann auch in diesem Fall der Äthylalkohol, von dem 37 γ (I') schon einen starken Effekt zeigen, durch Propyl- (II) oder Butylalkohol (III), wie auch durch Acetaldehyd (IV) oder Propionaldehyd (V) ersetzt werden.

Vorderhand habe ich für diese Beobachtung keine Erklärung, es sei denn, daß auch hier wieder die Oxalessigsäure, die bei der Oxydation eines Alkohols oder Aldehyds aus Brenztraubensäure gebildet wird, oder eines ihrer Umwandlungsprodukte im Spiele sind. Eine schon früher erwähnte Beobachtung (Fig. 12), daß in Gegenwart von Bernsteinsäure die Brenztraubensäure nahezu ebenso wirksam wie Alkohol oder Glucose ist, könnte als Stütze dieser Annahme angeführt werden. Trotzdem möchte ich diese Frage vorerst noch offen lassen, bis ein umfangreicheres Versuchsmaterial vorliegt.

Hinsichtlich der Wirkung des Alkohols in Gegenwart von Brenztraubensäure war angenommen worden, daß seine Oxydation die für die Synthese der Oxalessigsäure notwendige Energie liefern soll (S. 278). Die Tatsache, daß auch hier wieder der Äthylalkohol durch Propyl- und Butylalkohol, wie auch durch die entsprechenden Aldehyde ersetzt werden kann

(Fig. 20, vgl. auch S. 288), macht es recht wahrscheinlich, daß auch bei der Carboxylierung der Brenztraubensäure die Dehydrierung eines Aldehyds der energieliefernde Vorgang ist. Wie diese Koppelung zwischen Dehydrierung und Carboxylierung im einzelnen aussieht, muß offen bleiben; es darf aber erwartet werden, daß dieser Energieübertragung auch hier wieder ein stofflicher Mechanismus zugrunde liegt.

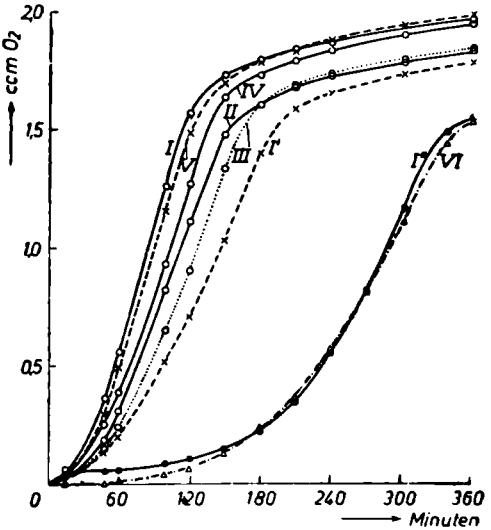


Fig. 20. Brenztraubensäure und verschiedene Zusätze.

Acetat überall $^{m}/_{60}$.

I, I', II—VI· 8×10^{-3} Mmol Na-Pyruvat.

I, I'': 2×10^{-3} Mmol Äthylalkohol. I': $0{,}8 \times 10^{-3}$ Mmol Äthylalkohol.

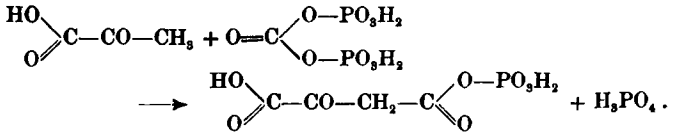
II: 2×10^{-3} „ Propylalkohol. III: 2×10^{-3} „ norm. Butylalkohol.

IV: 4×10^{-3} „ Acetaldehyd. V: 4×10^{-3} „ Propionaldehyd.

H. G. Wood und C. H. Werkman, welche die Carboxylierung der Brenztraubensäure entdeckt haben, und sich am eingehendsten mit dieser Reaktion befaßt haben, nehmen an, daß *Phosphorylierungen* dabei eine wichtige Rolle spielen[1]). Macht man sich diese Annahme zu eigen, dann könnte man daran denken, daß bei der Dehydrierung des Aldehyds eine phosphorylierte Kohlensäure gebildet wird, die dann in der Art eines

[1]) Bio. J. 34, 13 (1940); 35, 602 (1941).

Kohlensäureesters mit Brenztraubensäure eine Kondensation etwa folgender Art eingeht[1]):



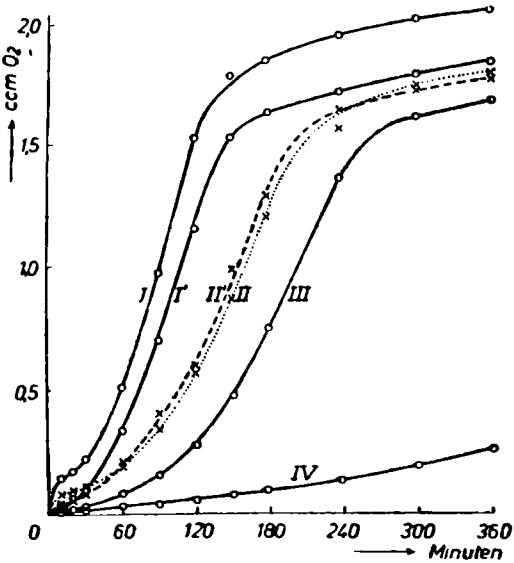


Fig. 21. Vergleich der Wirkungen von Alkohol und Brenztraubensäure.

	$^m/_{60}$-Acetat.				
I:	8×10^{-3} Mmol	Alkohol	+ 2×10^{-3} Mmol	Na-Pyruvat.
I':	2×10^{-3} „	„	+ 8×10^{-3} „	„
II:	4×10^{-3} „	„	+ 2×10^{-3} „	„
II':	2×10^{-3} „	„	+ 4×10^{-3} „	„
III:	2×10^{-3} „	„	+ 2×10^{-3} „	„
IV:	ohne Zusatz.			

In Fig. 21 ist ein Versuch wiedergegeben, in dem die Wirkung von Brenztraubensäure mit der von Äthylalkohol ver-

[1]) Vgl. im Zusammenhang damit die Arbeiten von V. H. Wallingford, A. H. Homeyer u. D. M. Jones [Am. Soc. 63, 2252 (1941)], welche die Anwendbarkeit der Kohlensäureester zur Synthese von β-Ketosäuren in vitro an einem umfangreichen Material nachweisen konnten.

glichen wurde. Um dabei vergleichbare Bedingungen zu schaffen, — der Alkohol kann nicht als Baustein für die Oxalessigsäure dienen, während die Brenztraubensäure hinwiederum nur in Gegenwart einer Spur Alkohol angegriffen wird, — enthielt jeder Ansatz neben einer größeren Menge Alkohol oder Brenztraubensäure, deren Wirkung auf die Induktionsperiode gemessen werden sollte, noch eine Mischung von je 2×10^{-3} Millimol Alkohol und Brenztraubensäure. Es wurde also nur der

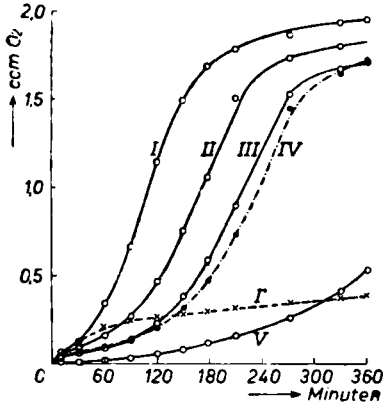


Fig. 22. Wirkung von Milchsäure.
I—V: 5×10^{-2} Mmol Na-Acetat. I, I', II—IV: 2×10^{-3} Mmol Alkohol.
I, I': 4×10^{-3} Mmol Na-Lactat.
II: 2×10^{-3} Mmol Na-Lactat. III: $0{,}8 \times 10^{-3}$ Mmol Na-Lactat.

zusätzliche Effekt von Alkohol und Brenztraubensäure verglichen. Wie aus Fig. 21 zu ersehen ist, macht es kaum einen Unterschied, ob Brenztraubensäure oder Alkohol zugesetzt wurde. Unter bestimmten Bedingungen können also Alkohol und Brenztraubensäure einander ersetzen. Dies führt aber zu der notwendigen Schlußfolgerung, daß die Wirkung von Alkohol und Brenztraubensäure mit der Dehydrierung des intermediär gebildeten Acetaldehyds zusammenhängt. Die Reaktionen, die zum Acetaldehyd führen, — beim Alkohol ein Dehydrierungsvorgang, bei der Brenztraubensäure die Decarboxylierung, — sind so grundverschieden, daß ihnen wohl kaum ein und dieselbe

Wirkung zukommen kann. Und gerade das würde ja verlangt werden, wenn man den spezifischen Effekt dieser Substanzen auf die Induktionszeit nicht dem daraus entstehenden Acetaldehyd zuschreiben wollte.

Der Vollständigkeit halber ist in Fig. 22 noch ein Versuch mit *Milchsäure* angeführt, der in den wesentlichen Punkten dem Versuch mit verschiedenen Mengen Brenztraubensäure (Fig. 19) entspricht. Auch dieser Versuch läßt sich mit der Annahme in Einklang bringen, daß der über Brenztraubensäure gebildete Acetaldehyd den Abbau der Essigsäure auslöst.

Besprechung der Ergebnisse.

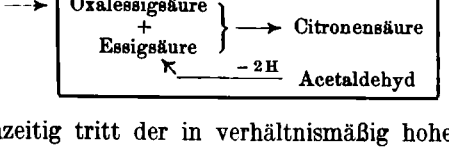
Die Betrachtungen über den Abbau der Essigsäure geben eine Erklärung dafür, daß Acetat nur durch intakte Zellen angegriffen wird, nicht aber durch Zellpräparate, oder gar durch isolierte Enzyme. Dieser Abbau spielt sich in einem derartig komplizierten System ab, dessen Komponenten in geeigneter Weise miteinander reagieren müssen, daß bisher nur in einer Zelle mit intakter Struktur die Voraussetzungen dafür gegeben scheinen.

Auch die Beobachtungen von K. Heicken[1]) beim Umsatz von Acetaldehyd durch verarmte Hefe erfahren nunmehr eine plausible Deutung. Heicken machte die Feststellung, daß Hefe auch unter aeroben Bedingungen Acetaldehyd zunächst dismutativ in Alkohol und Essigsäure überführt. Während der Alkohol unverändert liegen bleibt, wird die Essigsäure vollständig oxydiert. Wird der Hefe aber an Stelle von Acetaldehyd eine Mischung von Alkohol und Essigsäure angeboten, dann wird ausschließlich der Alkohol umgesetzt, während die Essigsäure keinerlei Veränderungen erfährt.

Entsteht die Essigsäure aus dem Acetaldehyd, dann sind alle Bedingungen dafür gegeben, daß sie über Citronensäure auch weiter abgebaut wird. Die der Synthese von Citronensäure zugrundeliegenden gekoppelten Reaktionen vereinfachen sich ja in dem besonderen Fall, daß Acetaldehyd das Substrat darstellt, in folgender Weise:

---

[1]) A. **534**, 68 (1938).



Gleichzeitig tritt der in verhältnismäßig hoher Konzentration zugesetzte Acetaldehyd mit dem Sauerstoff um den Wasserstoff der Dehydrierungsreaktionen in Konkurrenz, so daß sein Hydrierungsprodukt, der Äthylalkohol, auftreten muß. Ist aber der Äthylalkohol einmal entstanden, dann kann er, solange noch Acetaldehyd vorhanden ist, nicht mehr dehydriert werden[1]). Wird der Hefe dagegen eine Mischung von Alkohol und Essigsäure zugesetzt, dann liegen die Verhältnisse für den Abbau des Alkohols, und der daraus unter Wasserstoffverschiebung intermediär gebildeten Essigsäure ungleich günstiger, als für die zugesetzte Essigsäure, so daß letztere quantitativ liegen bleibt. Wird dabei mehr Essigsäure aus dem Alkohol gebildet, als über Citronensäure auch wieder abgebaut werden kann, dann nimmt die Essigsäure sogar zu, wie dies von Heicken in mehreren Versuchen beobachtet wurde.

Ob schließlich auch in anderen Zellen der Abbau der Essigsäure in dieser Form vor sich geht, muß die weitere Forschung ergeben. Es ist aber vorderhand nicht auszuschließen, daß auch in den Zellen der tierischen Gewebe beim Kohlehydratabbau intermediär Essigsäure entsteht, die dann über Citronensäure vollständig verbrannt wird. Die Tatsache, daß beim Abbau der Brenztraubensäure in Niere[2,3]), Leber[3]), Hoden[3]), Hirn[3,4]) und Jensen-Sarkom[5]) Essigsäure nachgewiesen werden konnte, und die Feststellung von H. A. Krebs[6]), daß die Brenztraubensäure in den tierischen Geweben über Citronensäure abgebaut wird, könnten dafür als

[1]) Vgl. Anm. 2, S. 290.

[2]) H. Wieland, O. Probst, H. Walch, W. Schwarze u. K. Rauch, A. **542**, 157 (1939).

[3]) H. A. Krebs u. W. A. Johnson, Bio. J. **31**, 645 (1937).

[4]) H. Weil-Malherbe, Bio. J. **31**, 309, 2202 (1937); C. Long, Bio. J. **32**, 1711 (1938).

[5]) Unveröffentlichte eigene Versuche.

[6]) Enzymol. **4**, 148 (1937); Bio. J. **34**, 442, 1234 (1940).

Hinweise dienen. Der negative Ausfall der Versuche auf enzymatischem Wege aus Essigsäure und Oxalessigsäure Citronensäure aufzubauen, kann nicht mehr als Argument gegen diese Annahme angeführt werden. Andrerseits kann aber auch die Tatsache, daß unter anaeroben Bedingungen aus Brenztraubensäure und Oxalessigsäure durch das komplexe System einer Zelle Citronensäure gebildet wird[1]), nicht als endgültiger Beweis dafür angesehen werden, daß die Citronensäure über Oxalcitramalsäure[2]) entstanden ist. Es ist durchaus möglich, daß auch hier durch Dismutation[3]) oder Dehydrierung[4]) der Brenztraubensäure Essigsäure gebildet wird, die dann mit Oxalessigsäure die Kondensation zu Citronensäure eingeht. Die Voraussetzung für diese Kondensation würde in diesem Falle durch den Übergang der Brenztraubensäure in Essigsäure gegeben, einen Vorgang, der in seinem Chemismus große Ähnlichkeit mit der Dehydrierung des Acetaldehyds durch Hefe zeigt[5]).

Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* möchte ich für die Gewährung eines Stipendiums meinen besten Dank aussprechen. Der *Bayerischen Akademie der Wissenschaften* bin ich für finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit verpflichtet.

---

[1]) H. A. Krebs u. Mitarb., Enzymol. 4, 148 (1937); Bio. J. 34, 1234 (1940); F. L. Breusch, Bio. J. 33, 1762 (1939).

[2]) F. Knoop u. C. Martius, H. 242, I (1936).

[3]) Vgl. Anm. 3, S. 305.

[4]) In diesem Fall wird der Wasserstoff der Brenztraubensäure auf Oxalessigsäure verschoben.

[5]) Vgl. Anm. 1 und 2, S. 291.

(Abgeschlossen am 28. September 1942.)

Verantwortlich für die Redaktion: i. V. Dr. E. Dane, München; für den Anzeigenteil: Anton Burger, Berlin-Tempelhof — Verlag Chemie, G. m. b. H. (Geschäftsführer: Senat. e. h. H. Degener), Berlin W 35, Woyrschstr. 37
Zur Zeit ist Anzeigen-Preisliste Nr. 3 gültig — Printed in Germany
Druck: Metzger & Wittig, Leipzig